

Université de Montréal

Induction des gènes pro-inflammatoires suite à  
l'activation de PAR-2 à la membrane nucléaire.

Par

Satra Nim

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en science (M.Sc.)

Janvier, 2006

© Satra Nim, 2006



W  
4  
U58  
2006  
V087

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Induction des gènes pro-inflammatoires suite à  
l'activation de PAR-2 à la membrane nucléaire.

Présenté par :  
Satra Nim

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

-----Dr. Eric Thorin-----  
Président-rapporteur

-----Dr. Sylvain Chemtob-----  
Directeur de recherche

-----Dr. Janos Filep-----  
Membre du jury

## SOMMAIRE

Il a été démontré que les récepteurs nucléaires transmembranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), spécifiquement des prostanoïdes et du facteur activant les plaquettes (PAF) ont des fonctions de transcription de gènes, tandis que les récepteurs au niveau de la membrane plasmique semblent plutôt induire des effets aigus indépendant de transcription de gènes. Par contre, la présence de RCPG au noyau n'est pas universelle. Les récepteurs activés par protéase (PAR) sont des RCPG. Ils sont activés par le clivage d'une partie N-terminale du récepteur. Ce clivage génère un ligand à l'extrémité de la partie N-terminale qui interagit avec les domaines extracellulaires du récepteur. Il existe 4 types de PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4. PAR-1 et 2 peuvent induire des effets mitotiques. Un mécanisme de telle complexité pourrait être médié par une action intracrine, telle que décrit pour les RCPG ayant des lipides comme ligand; ceci demeure à être démontré pour les RCPG avec peptides (liés) comme ligand, dont les PARs.

Le but de ce travail est d'étudier les propriétés de PAR-2 au niveau de l'inflammation dans les cellules BOSC (cellules épithéliales rénales embryonnaires humaines). Notre hypothèse est qu'il existe deux populations de PAR-2 se retrouvant à la membrane plasmique et au niveau de la membrane nucléaire. Ces deux populations de PAR-2 joueraient des rôles différents dans les processus inflammatoires étant donné leur localisation différente dans la cellule. Nous pensons aussi qu'une partie de la population de PAR-2 au niveau de la membrane nucléaire provient de la membrane plasmique.

La mobilisation de PAR-2 a été étudiée à l'aide de la microscopie confocale et par Western Blot. La pureté des fractions cellulaires a été analysée par Western Blot. L'expression des gènes impliqués dans l'inflammation a été analysée par RT-PCR.

PAR-2 est transloqué de la membrane plasmique à la membrane nucléaire dans les cellules BOSC suite à sa stimulation. Il existe déjà une population endogène de PAR-2 se trouvant à la membrane nucléaire. La population de PAR-2 au niveau de la membrane plasmique permet une augmentation de l'ARNm de IL-1 suite à son activation pendant 15 minutes et le niveau d'expression revient à la base après trois heures de stimulation. L'activation de PAR-2 se trouvant à la membrane nucléaire entraîne augmentation de l'expression de l'ARNm de ICAM-1, IL-1 et IL-8. Après trois heures de stimulation, les niveaux d'expression de ICAM-1 et IL-1 sont plus faibles que le niveau basal tandis que le niveau d'expression de IL-8 retourne à son niveau basal. L'augmentation de l'expression de IL-1 par la population de PAR-2 à la membrane plasmique est dépendante de l'activation de ERK1/2 suite à l'activation du récepteur. La voie signalétique dépendante de p38 est responsable de l'élévation du niveau d'expression de IL-1 après la stimulation de PAR-2 nucléaire.

En conclusion, PAR-2 est transloqué à la membrane nucléaire après son activation pour rejoindre une population de PAR-2 déjà existante au niveau nucléaire. PAR-2 au niveau de la membrane plasmique diffère de PAR-2 au noyau dans la régulation des gènes pro-inflammatoires.

Mots clés : Récepteur couplé aux protéines G, internalisation, translocation, membrane nucléaire, inflammation.

## ABSTRACT

The presence of nuclear transmembrane receptors, specifically for prostanoids and platelet-activating factor (PAF), was reported to evoke functions related to gene transcription while plasma membrane receptors induced mostly acute non-genomic effects. The existence of GPCR at the nucleus is not universal. Protease activated receptors (PARs) are members of the GPCR family. They are activated by the cleavage of the N-terminal part of the receptor and the binding of a tethered ligand on the receptor. There are 4 types of PARs: PAR-1, PAR-2, PAR-3 and PAR-4. PAR-1 and 2 can induce mitogenic effects. Although many responses induced by PARs can result from its interaction with cell surface GPCR, intracrine effects of PARs have also been proposed based largely on pharmacological binding studies. However, the mechanisms by which PARs can elicit gene expression are unknown.

The purpose of this study is to evaluate the roles of PAR-2 in the inflammatory processes in the BOSC cells (human epithelial embryonic kidney cells). We hypothesized that PAR-2 may also exist at the cell nucleus where they would contribute in serving particular functions, specifically induction of major proinflammatory genes. The roles of PAR-2 at different locations are different since signaling mediators and second messengers coupled to nuclear and plasma membrane PAR-2 of the same cell type seem to differ. We also think that a part of the receptor at the nuclear membrane comes from the plasma membrane after its activation.

Mobilization of PAR-2 was studied using confocal microscopy and Western Blot. The purity of each cell fractions was analyzed by Western Blot. Proinflammatory gene expression was evaluated by RT-PCR and by Western Blot.

PAR-2 is translocated to the nuclear membrane after its stimulation in the BOSC cells. We detected the presence of endogenous PAR-2 at the nuclear membrane. PAR-2 at the plasma membrane induced IL-1 expression after 15 minutes of activation and the level of expression returned to the baseline after 3 hours. Nuclear membrane PAR-2 increased the expression of ICAM-1, IL-1 and IL-8 after one hour of stimulation and the levels of expression of ICAM-1 and IL-1 were lower than the basal levels after 3 hours of stimulation. IL-8 expression returned to basal level after 3 hours of activation of the receptor. The increase of IL-1 expression induced by activation of plasma membrane PAR-2 was attenuated by inhibition of ERK1/2. The increase of IL-1 expression induced by nuclear membrane PAR-2 is dependent on the p38 signaling pathway.

In conclusion, PAR-2 is translocated to the nuclear membrane after its stimulation. PAR-2 at the cell nuclear membrane differs from PAR-2 at the cell surface, specifically in the induction of major proinflammatory genes.

**Key Words:** G-protein coupled receptor, internalization, translocation, nuclear membrane, inflammation.



**TABLE DES MATIÈRES**

Sommaire	iii
Table des matières	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Dédicace	xii
Remerciements	xiii
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. Les récepteurs couplés aux protéines G</b>	<b>3</b>
1.1 Structure et fonction des récepteurs couplés aux protéines G	3
1.2 Les protéines G	4
1.3 Signalisation des RCPG	5
1.4 Les GTPases	6
1.5 Endocytose des RCPG	7
1.5.1 Endocytose et induction du signal	8
1.6 Désensibilisation des RCPG	9
<b>2. Translocation des récepteurs au noyau</b>	<b>10</b>
<b>3. Inflammation</b>	<b>12</b>
<b>4. Les récepteurs activés par protéases</b>	<b>13</b>
4.1 Structure et fonction de PAR-2	14
4.2 Signalisation via PAR-2	16

4.3 Endocytose et désensibilisation de PAR-2	17
4.4 Rôles pro-inflammatoires de PAR-2	18
4.5 Rôles anti-inflammatoire de PAR-2	21
4.6 Autres fonctions de PAR-2	22
4.6.1 Rôles de PAR-2 dans la coagulation	23
 <b>II. HYPOTHÈS ET OBJECTIFS</b>	 25
 <b>III. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	 28
 <b>IV. RÉSULTATS</b>	 34
 <b>V. DISCUSSION</b>	 39
 <b>VI. DIRECTIONS FUTURES</b>	 48
 <b>VII. FIGURES</b>	 52
 <b>VIII. BIBLIOGRAPHIE</b>	 75

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 :	Internalisation de PAR2 dans les cellules BOSC.	51
Figure 2 :	Translocation de PAR-2 de la membrane plasmique à la membrane nucléaire suite à la stimulation par la trypsine 100 nM dans les cellules BOSC.	53
Figure 3 :	Pureté des différentes fractions cellulaires.	55
Figure 4 :	Activation de PAR2 à la membrane plasmique pendant 1 heure et analyse de l'expression des gènes.	57
Figure 5 :	Activation de PAR2 à la membrane plasmique pendant 3 heure et analyse de l'expression des gènes.	59
Figure 6 :	Activation de PAR2 à la membrane nucléaire pendant 1 heure et analyse de l'expression des gènes.	61
Figure 7 :	Activation de PAR2 à la membrane nucléaire pendant 3 heure et analyse de l'expression des gènes.	63
Figure 8 :	Activation de PAR2 à la membrane plasmique et analyse de l'expression des gènes en fonction du temps.	65
Figure 9 :	Activation de PAR2 à la membrane nucléaire et analyse de l'expression des gènes en fonction du temps.	67
Figure 10 :	Effet des inhibiteurs de ERK1/2, p38 et JNK sur l'expression des gènes suite à l'activation de PAR2 à la membrane plasmique.	69
Figure 11 :	Effet des inhibiteurs de ERK1/2, p38 et JNK sur l'expression des gènes suite à l'activation de PAR2 à la membrane nucléaire.	71

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
AP-2 : protéine adaptine 2  
ARN : acide ribonucléique  
ARNO : ADP ribosylation factor nucleotide-binding site opener  
 $\beta_2$ AR : récepteur bêta-adrénergique 2  
CGRP : calcitonin gene-related peptide  
EGF : facteur de croissance épidermique  
ERK : kinase régulée par un signal extracellulaire  
FGF : facteur de croissance des fibroblastes  
FGFR1 : récepteur du facteur de croissance des fibroblastes 1  
GEF : facteur d'échange de nucléotide guanine  
GH : hormone de croissance  
GMP : guanosine monophosphate  
GDP : guanosine diphosphate  
GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G  
GTP : guanosine triphosphate  
ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1  
IL-1 : interleukine 1  
IL-6 : interleukine 6  
IL-8 : interleukine 8  
JNK : protéine kinase cJun N-terminal/stress-activated  
LPA : acide lisophosphatidique  
MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes  
NLS : signal de localisation nucléaire  
PAF : facteur activateur de plaquette  
PAO : oxide phénylarsine  
PAR : récepteur activé par protéase  
PLC : phospholipase C

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

SP : substance P

TF : facteur tissulaire

TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale alpha

VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire 1

VEGFR : récepteur du facteur de croissance épidermal vasculaire

## DÉDICACE

J'aimerais dédier ce mémoire à mes parents ainsi  
qu'à ma sœur pour leur soutien et leurs encouragements  
tout au long de ma maîtrise.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier les organismes subventionnaires qui m'ont accordé des bourses d'études :

**IRSC (Institut de recherche en santé du Canada)**  
**Bourse de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine**  
**Bourse du département de pharmacologie de l'université de Montréal**

Au court de ma maîtrise, j'ai eu la chance de travailler avec plusieurs personnes qui m'ont supporté dans mes expériences de recherche.

**Sylvain Chemtob** : mon directeur de maîtrise, je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans votre laboratoire et de vos précieux conseils pour mon projet de recherche.

**Tang Zhu** : assistant de recherche, Tang est toujours disponible pour m'aider dans mes expériences et pour me partager ses connaissances dans le domaine de la recherche. C'est un plaisir de travailler avec toi.

**Nikolaus Heveker** : directeur de recherche et professeur au département de biochimie de l'université de Montréal. Dr. Heveker est très généreux de son temps et toujours prêt à nous donner des conseils pour faire avancer notre projet de recherche.

**Lenka Rihakova** : étudiante post-doctorat, merci pour tes conseils et pour ton temps. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi et de partager mes résultats de recherche.

**Hensy Fernandez** : technicienne de laboratoire, toujours dédiée à bien faire son travail et d'une grande aide pour nous tous au laboratoire. Merci pour ton aide.

**Alejandro Vazquez-Tello** : assistant de recherche, qui m'a appris beaucoup au niveau de la biologie moléculaire et qui n'a cessé de m'encourager, merci.

## **I. INTRODUCTION**



Pour s'adapter à son environnement extracellulaire, les cellules perçoivent les stimuli externes par des récepteurs pour les hormones, les facteurs de croissance, les ligands et la matrice extracellulaire. La liaison de ces molécules avec les récepteurs permet aux cellules d'induire des réponses intracellulaires ou de communiquer entre-elles. Ces molécules en circulation peuvent agir dans un environnement immédiat de la cellule et ce processus est appelé la communication paracrine. La communication autocrine permet aux cellules de sécréter des substances dans le milieu extracellulaire pouvant se lier sur leurs propres récepteurs pour induire des changements internes. Un nombre d'études ont démontré qu'il existe un mode de communication cellulaire par des ligands peptidiques via des actions intracrines, c'est-à-dire des actions générées à l'intérieur de la cellule. Ce type de communication a été montré pour l'insuline, l'hormone de croissance, le facteur de croissance des fibroblastes, la prolactine, l'angiogénine, les prostaglandines, le facteur activateur de plaquettes, l'acide lysophosphatidique ainsi que l'angiotensine (GOBEIL et al., 2003; GOBEIL et al., 2002; MARRACHE et al., 2005; MERTANI et al., 2003; RE, 1999; RE & PARAB, 1984; REILLY et al., 2004). Il a été suggéré que la localisation nucléaire des récepteurs de ces facteurs est essentielle pour la régulation des gènes, l'augmentation ou l'inhibition des effets induits par les récepteurs à la surface membranaire, le maintien de l'hémostase cellulaire et la régulation de la prolifération cellulaire. De plus, pour certains récepteurs, l'internalisation est nécessaire pour permettre une réponse biologique tel que démontré pour les récepteurs de l'hormone parathyroïde et de la somatostatine (HENDERSON et al., 1995; SARRET et al., 1999). Des études ont établi que la présence de ces récepteurs à

la membrane nucléaire s'avère essentielle pour la transcription des gènes tandis que les récepteurs à la membrane plasmique peuvent jouer majoritairement des rôles non-génomiques et induisent des effets à court terme (BHATTACHARYA et al., 1998; GOBEIL et al., 2002; MARRACHE et al., 2002).

## **1. Les récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) font partie de la grande super-famille des récepteurs à signaux de transduction. Ils régulent diverse processus physiologiques incluant la vision, l'olfaction, l'inflammation, l'immunité, la cognition, la perception de la douleur, les fonctions cardiaques et la neurotransmission (LEFKOWITZ, 1993; NEER, 1995; SURYA et al., 1998). En raison de ses nombreuses implications dans ces processus physiologiques, ces récepteurs représentent des cibles primaires pour le développement des drogues.

### **1.1 Structure et fonctions des récepteurs couplés aux protéines G**

Les RCPG sont composés d'un seul polypeptide et possèdent sept régions transmembranaires hydrophobes. Ces domaines transmembranaires sont caractérisés par des hélices alpha et sont orientés de façon perpendiculaire à la membrane plasmique. La partie N-terminale se situe au niveau extracellulaire et possède des sites de glycosylation. Le segment C-terminal est localisé dans le cytosol et contient des sites de phosphorylation et d'autres modifications post-traductionnelles. Ces récepteurs sont responsables des actions physiologiques de la majorité des hormones, des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs. Presque 80 % des signaux provenant des

hormones sont dus à l'activation de ces récepteurs et plus de 5 % du génome humain code pour les RCPG. Les RCPG permettent la transduction des signaux provenant de l'extérieur de la cellule en servant de facteur d'échange des nucléotides guanine pour une famille de protéines hétérotrimériques liant le GTP (protéine G) (COLLINS et al., 1992).

## 1.2 Les protéines G

Les protéines G régulent de nombreux effecteurs cytoplasmiques. Ces protéines sont composées de trois sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Dans sa forme inactive, la sous-unité  $\alpha$  est liée au GDP. Lorsque la protéine G est stimulée par un récepteur activé, la sous-unité  $\alpha$  relâche son GDP et l'échange pour une GTP. Cet échange entraîne une dissociation de la sous-unité  $\alpha$  des sous-unités  $\beta\gamma$ . Les différentes composantes de la protéine G ont pour cibles soit des enzymes ou des canaux ioniques. L'hydrolyse du GTP par la sous-unité  $\alpha$  permet sa ré-association avec les sous-unités  $\beta\gamma$ . L'activation des protéines  $G_\alpha$  et  $G_{\beta\gamma}$  peut réguler de façon positive ou négative les effecteurs comme la phospholipase, l'adénylate cyclase et les canaux ioniques. La famille des protéines G transductrice de signaux comprend plusieurs membres dont les protéines  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_t$  et  $G_{olf}$ . La protéine  $G_s$  « stimulante » permet d'activer l'adénylate cyclase qui va induire la formation d'AMPc. L'AMPc agit comme second messenger pour activer ou inhiber de nombreuses enzymes ou cascades signalétiques. La protéine  $G_i$  « inhibitrice » va inhiber l'adénylate cyclase et possède probablement les mêmes sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  que les protéines  $G_s$ , mais une sous-unité  $\alpha$  différente. Les protéines  $G_q$  font intervenir les phosphatidylinositols dans le système de signalisation. La phosphodiesterase permettant l'hydrolyse du GMP cyclique en GMP est activée par la protéine  $G_t$  « transducine ». La protéine  $G_{olf}$  est exprimée dans

les neurones sensoriels olfactifs et régule la transduction du signal olfactif. (KAZIRO et al., 1991; LEFKOWITZ & CARON, 1988; LEVITZKI, 1988; MAJERUS, 1992)

L'activation des RCPG peut aussi causer une activation des protéines de la famille des petites protéines G (GTPase), Ras et Rho. Ces GTPases peuvent influencer la réponse signalétique des RCPG et leur mouvement intracellulaire.

### **1.3 Signalisation des RCPG**

Un bon nombre de récepteurs couplés aux protéines G engendrent des signaux qui permettent la régulation de la différenciation et la croissance cellulaire, incluant l'activation des GTPases de la famille Ras et la stimulation des voies des protéines kinases activées par les mitogènes (MAP kinase). Les mécanismes permettant l'activation des voies des MAP kinases varient selon le type de RCPG ainsi que le type cellulaire. Les kinases activées par les mitogènes sont des kinases à sérine/thréonine très conservées durant l'évolution et sont impliquées dans la transduction des signaux provenant de l'extérieur de la cellule. Elles permettent la régulation de la croissance cellulaire, la division, la différenciation et l'apoptose. Les cellules de mammifère possèdent trois classes majeures de MAP kinase, la classe des ERK (extracellular signal-regulated kinases, celle de JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) et la classe de p38/HOG1 MAP kinases. La voie de ERK est importante pour le contrôle de la transition G0-G1 du cycle cellulaire, pour le passage des cellules en mitose ou en méiose et pour la régulation de la survie cellulaire par un effet antiapoptotique. D'un autre côté, les MAP kinases JNK/SAPK et p38/HOG1 sont impliquées dans la régulation de l'arrêt de la croissance cellulaire, l'apoptose et l'activation des cellules immunitaires

et réticuloendothéliale en réponse aux stress hormonal et environnemental (PEARSON et al., 2001). Les MAP kinases sont régulées via une cascade comprenant une série de kinases. Chaque voie est composée de trois kinases qui se phosphorylent et s'activent successivement. Une fois activées, les MAP kinases vont phosphoryler des substrats membranaires, cytoplasmiques, nucléaire et cytosquelettique. Les mécanismes utilisés par les RCPG pour stimuler les MAP kinases comprennent l'induction des signaux initiés par les effecteurs des protéines G comme les protéines kinase A et C et le calcium intracellulaire. Les signaux provenant de la transactivation avec les récepteurs à tyrosine kinase permettent aussi l'activation des MAP kinases. Finalement, un des mécanismes utilisé par les RCPG pour activer les MAP kinases est l'induction des signaux initiés par l'interaction directe avec les bêta-arrestines et les composantes de la cascade des MAP kinases.

#### **1.4 Les GTPases**

La famille des petites protéines G contient plus de 100 membres classifiés dans cinq catégories différentes : la famille Ras, Rho, Arf, Rab et Ran GTPase. Ces GTPases ont une masse moléculaire qui varie de 20 à 30 kDa et sont sous la forme monomérique. De façon générale, la famille des Ras GTPases régule les signaux cellulaires qui affectent la transcription des gènes. La famille des Rho GTPases fonctionne comme régulateur du cytosquelette d'actine et influence aussi la transcription des gènes. La formation, la fusion et le mouvement des vésicules entre les différents compartiments cellulaires sont régulés par la famille des Rab et Arf GTPases. Finalement, la famille des Ran GTPases sont des régulateurs du transport nucléocytoplasmique des protéines et de l'organisation

des microtubules. Tous ces GTPases fonctionnent en créant un cycle entre une forme liée au GDP (forme inactive) et une forme liée au GTP (forme active) (BOS, 1998; TAKAI et al., 2001). Au niveau de l'endocytose des RCPG, Arf GTPase joue un rôle essentiel. Arf6 est impliqué dans la régulation de l'endocytose des récepteurs et dans le recyclage des vésicules endosomales. Son activité est régulée par deux facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF), ARNO (ADP ribosylation factor nucleotide-binding site opener) et EFA6. Il a été démontré que ARF1 joue aussi un rôle dans l'endocytose des RCPG. (CLAING et al., 2001; MITCHELL et al., 1998). Les Rab GTPases sont importants pour la régulation de l'endocytose, l'exocytose et la fusion des endosomes (ROSENFELD et al., 2002; SEACHRIST & FERGUSON, 2003; ZERIAL & MCBRIDE, 2001). Il existe 60 différents Rab GTPases et leur structure est grandement conservée. Chaque Rab possède une localisation intracellulaire distincte. Certains Rab GTPases comme Rab1, Rab4, Rab5, Rab7 et Rab11 ont des rôles dans le transport des molécules entre le réticulum endoplasmique et le l'appareil de Golgi, dans l'endocytose et le mouvement des RCPG entre les endosomes et les lysosomes.

### **1.5 Endocytose des RCPG**

L'endocytose des RCPG est un processus permettant au récepteur d'être internalisé vers des compartiments intracellulaires. Les récepteurs peuvent soit être internalisés de façon constitutive, soit de façon induite par la liaison de leurs ligands. Il existe plusieurs voies d'endocytose des récepteurs. La voie majeure d'internalisation est la voie dépendante de la clathrine qui est acheminée par des vésicules recouvertes majoritairement de clathrine et du complexe AP-2. Le complexe adaptateur AP-2

engendre la polymérisation de la clathrine à la membrane plasmique et permet l'internalisation des molécules par la fission des vésicules, une étape dépendante de la dynamine, une GTPase permettant le détachement des vésicules de la membrane plasmique. Les récepteurs peuvent aussi emprunter la voie d'endocytose dépendante des cavéoles. Celles-ci sont des invaginations lisses de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipide (PALADE, 1953). Les cavéolines sont des protéines s'associant au cholestérol avec une faible densité et elles décorent la surface cytosolique des cavéoles. Il existe trois isoformes de la cavéoline : cavéoline-1, 2 et 3. Les cavéolines-1 et 2 sont exprimés dans une grande variété de tissus et types cellulaire tandis que la cavéoline-3 est exprimée de façon spécifique aux cellules musculaires, aux astrocytes et aux chondrocytes (NISHIYAMA et al., 1999; OKAMOTO et al., 1998; SCHERER & LISANTI, 1997; SCHWAB et al., 1999; SONG et al., 1996; TANG et al., 1996). Les cellules qui n'expriment pas ou peu la cavéoline-1 ont une faible quantité de cavéoles à la membrane plasmique. Il a été démontré que la ré-introduction de la cavéoline-1 dans ces cellules permet d'induire la formation des cavéoles. (ENGELMAN et al., 1997; FRA et al., 1995; KOLESKE et al., 1995; LE et al., 2002; MIRRE et al., 1996; ORLANDI & FISHMAN, 1998; SMART et al., 1996). De façon similaire, les cavéoles sont absentes dans les cellules endothéliales de souris knock out en cavéoline-1. (DRAB et al., 2001; RAZANI et al., 2001).

### 1.5.1 Endocytose et induction du signal

L'internalisation du récepteur ainsi que son ligand est aussi un moyen pour les cellules de générer une cascade signalétique qui est indépendante des protéines G. En

effet, l'internalisation peut permettre de prolonger la durée du signal engendré par l'activation du récepteur au niveau de la membrane plasmique en maintenant une activité au niveau de l'endosome (GRIENDLING et al., 1987; HUNYADY et al., 1991). Les complexes ligand-récepteurs au niveau des endosomes peuvent aussi enclencher une nouvelle cascade signalétique distincte de celle engendrée par ces complexes au niveau de la membrane plasmique. En effet, il a été démontré que l'internalisation des RCPG permet une transduction du signal emmenant à l'activation de la voie des MAP kinases et elle joue un rôle dans la régulation de la transcription de certains gènes (LUTTRELL et al., 1997; SOUAZE et al., 1997). Dans les fibroblastes de rat 1a, l'inhibition de l'endocytose dépendante de la clathrine a pour effet de bloquer l'activation des kinases ERK (LUTTRELL et al., 1997).

## **1.6 Désensibilisation des RCPG**

La re-localisation ainsi que certaines fonctions cellulaires spécifiques sont impliquées dans la régulation et la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G. La désensibilisation rapide est caractérisée par un découplage des récepteurs des protéines G et cela sans modifier le nombre de récepteurs présents dans les cellules (CLARK, 1986). Pour certains RCPG, leur désensibilisation se fait par un processus appelé séquestration qui implique la redistribution des récepteurs de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires (STAEHELIN & SIMONS, 1982; TOEWS & PERKINS, 1984; VON ZASTROW & KOBILKA, 1992). La désensibilisation lente des récepteurs implique une diminution du nombre total de récepteurs et est induite sur une longue période de temps variant de quelques heures ou



quelques jours suite à l'activation de ceux-ci. L'activation du récepteur va induire la phosphorylation de celui-ci par le PKC, PKA et/ou les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK). La liaison d'une protéine adaptatrice au récepteur phosphorylé, arrestine, entraînera le découplage du récepteur de la protéine G et une séquestration de ce récepteur par des vésicules tapissées de clathrine. Cette internalisation est dépendante de la dynamine. Il est maintenant évident que les séquences cytosoliques des RCPG sont responsables de l'interaction directe avec les molécules des vésicules de transport. Les protéines sont internalisées dans des vésicules appelées endosomes de triage. Les protéines dans ces endosomes peuvent être recyclées à la membrane plasmique, transportées dans le compartiment de recyclage endosomal pour un retour éventuel à la membrane plasmique ou peuvent se retrouver dans des endosomes tardifs. En raison du pH faible au niveau de la lumière de l'endosome de triage il y a une dissociation entre le ligand et son récepteur (PRESLEY *et al.*, 1997). Il a été démontré que l'ubiquitination du  $\beta_2$ AR et du récepteur à chemokine CXCR4 est important pour l'acheminement de ces récepteurs vers les lysosomes et pour leur dégradation (MARCHESE & BENOVIĆ, 2001; SHENOY *et al.*, 2001). Pour certains récepteurs comme celui du  $\delta$ -opiod, l'ubiquitination n'est pas essentielle pour l'internalisation du récepteur vers les lysosomes (TANOWITZ & VON ZASTROW, 2002).

## **2. Translocation des récepteurs au Noyaux**

Il existe plusieurs études démontrant la présence de facteurs de croissance, de cytokines ainsi que leurs récepteurs au noyau cellulaire. En effet, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance épidermique (EGF), l'hormone de

croissance (GH) et d'autres ligands de même que leurs récepteurs sont ciblés vers le noyau (LIN *et al.*, 2001; LOBIE *et al.*, 1994; MAHER, 1996; STACHOWIAK *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2004). Les mécanismes permettant la translocation des récepteurs à la membrane plasmique ainsi que leurs ligands extracellulaires vers le noyau ne sont pas bien connus. Il a été démontré pour le récepteur FGFR1 que sa translocation au noyau est dépendante de la voie des endosomes et requiert la dynamine et la protéine ARF6 (BRYANT *et al.*, 2005). Des études ont suggéré que des mécanismes dépendants des lipides et/ou des cavéolines sont responsables de la translocation des récepteurs au noyau. (CITORES *et al.*, 2001; CITORES *et al.*, 1999). Étant donné que les récepteurs ainsi que leurs ligands sont retrouvés au noyau, des chercheurs ont suggéré que ces deux protéines sont internalisées et transloquées ensemble au noyau. Le mécanisme de régulation de l'importation des protéines au noyau le plus connu est celui impliquant les signaux de localisation cellulaire (NLS) et les protéines de la famille des importines avec le Ran GTPase (PEMBERTON & PASCHAL, 2005). Dans certains cas, les NLS contiennent plusieurs acides aminés basiques. C'est le cas pour les histones et les protéines ribosomiques. Les protéines se liant à l'ARN contiennent des NLS riches en arginine et en glycine (JAKEL & GORLICH, 1998; LESLIE *et al.*, 2004; SENGER *et al.*, 1998). Dans d'autres cas, le domaine NLS peut être plus grand et est riche en glycine et déficient en acides aminés basiques (POLLARD *et al.*, 1996). L'importine- $\alpha$  se lie avec la protéine cible dans le cytoplasme via la reconnaissance du NLS et l'importine- $\alpha$  forme un hétérodimère avec l'importine- $\beta$ . Ce complexe permet la translocation de la protéine cible au noyau. Une fois dans le noyau, les importines s'associent au RanGTP et le complexe entraîne la dissociation du cargo. Certaines protéines peuvent être transloquées

au noyau sans avoir de NLS ou possédant un NLS non encore identifié. Dans le noyau, le complexe ligand-récepteur se lie aux éléments de réponse à l'ADN et recrute les facteurs permettant l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription.

### **3. Inflammation**

L'inflammation est une réponse au dommage tissulaire et peut être causée par des substances chimiques, des micro-organismes, des dommages physiques ou d'autres substances. La réponse inflammatoire consiste en un changement du flôt sanguin, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un recrutement des cellules du sang dans les tissus endommagés. L'endothélium endommagé va exprimer des molécules d'adhésion qui vont se lier aux leucocytes en circulation dans le sang. Ces molécules d'adhésion comprennent les sélectines P et E, les membres de la famille des immunoglobulines, les molécules d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et les molécules d'adhésion vasculaire 1 (VCAM-1). Les sélectines permettent un roulement des leucocytes le long de l'endothélium tandis que ICAM-1 et VCAM-1 permettent un attachement plus solide des leucocytes à l'endothélium (ADAMS & SHAW, 1994; TEDDER *et al.*, 1995). Une fois que les leucocytes sont adhérentes à l'endothélium, elles sont attirées par des molécules chemoattractantes et migrent dans l'espace sous-endothélial (BAGGIOLINI, 1998). Les cellules polymorphonucléaires (PMN), par exemple les neutrophiles, sont attirées par IL-8 et par le facteur activateur de plaquette (PAF). Dans l'espace sous-endothélial, les lymphocytes T contribuent à la réponse inflammatoire ainsi que les macrophages. L'activation des cellules T entraîne l'expression de l'interféron- $\gamma$  et la lymphotoxine qui va amplifier l'état d'inflammation.

Les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vont produire le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) qui avec l'interféron- $\gamma$  et l'interleukine-1 (IL-1) vont stimuler la production de IL-6 de la part des cellules musculaire lisse (BARATH *et al.*, 1990; NG *et al.*, 1994; SANCEAU *et al.*, 1995; WARNER & LIBBY, 1989). IL-6 est le stimulus principal de la protéine réactive C (CRP) (HEINRICH *et al.*, 1990).

#### **4. Les récepteurs activés par protéase**

Les récepteurs activés par protéase (PAR) font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont activés suite à un clivage de la partie N-terminale du récepteur générant ainsi un ligand à l'extrémité de la partie N-terminale qui interagit avec les domaines extracellulaires du récepteur (VU *et al.*, 1991). L'activation de ceux-ci peut également se produire suite à la liaison d'un ligand synthétique ayant la même séquence peptidique que le ligand naturel : SLIGKV pour les humains et SLIGRL pour les souris. Quatre types de PAR ont été découverts jusqu'à présent : PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4. Les PAR sont distribués un peu partout dans les tissus humains et se retrouvent en grande concentration dans l'intestin, le rein, le colon et l'estomac. Des études ont démontré que les PAR peuvent induire des effets mitogéniques, plus spécifiquement la néovascularisation (MILIA *et al.*, 2002). PAR-1, 3 et 4 sont activés par la thrombine. PAR-2 diffère des autres PAR dans le fait qu'il n'est pas activé par la thrombine, mais par la trypsine et la tryptase des mastocytes. La trypsine est souvent reliée à l'enzyme digestive sécrétée par le pancréas lors de la digestion. Cependant, la trypsinogène est exprimée par les cellules endothéliales, épithéliales, les tumeurs et les neurones et la trypsine extra-pancréatique peut activer PAR-2 (ALM *et al.*, 2000;

KOIVUNEN *et al.*, 1991; KOSHIKAWA *et al.*, 1997; KOSHIKAWA *et al.*, 1994; WIEGAND *et al.*, 1993). Un nombre important d'enzymes de la famille de la trypsine endogènes ou exogènes peuvent cliver et activer PAR-2. Une variété de cellules cancéreuses humaines sécrètent des enzymes ayant une spécificité comme la trypsine pouvant activer PAR-2 (KOSHIKAWA *et al.*, 1997). Parmi les membres de la famille de la trypsine pouvant activer PAR-2, on dénote la trypsinogène 2 endothéliale, la maptriptase, la protéinase-1 à sérine et la trypsinogène 4 générée par les kératynocytes au niveau de la peau. (ALM *et al.*, 2000; KOSHIKAWA *et al.*, 1997; OBERST *et al.*, 2001; STEINHOFF *et al.*, 2005; TAKEUCHI *et al.*, 2000). La trypsine et la tryptase engendrent un clivage à la position Arginine<sup>36</sup> et Sérine<sup>37</sup>. Ce clivage va exposer un ligand toujours attaché au récepteur à la partie N-terminale et ce ligand va se lier à une séquence conservée sur la deuxième boucle extracellulaire de PAR-2. Contrairement à la trypsine, la tryptase ne peut activer complètement PAR-2 sous sa forme glycosylée (COMPTON *et al.*, 2001). Ce mécanisme de contrôle de l'activation n'a pas été observé chez les autres membres de la famille des RCPG. Nous ne savons pas toutefois si la glycosylation des domaines N-terminaux de PAR-2 et PAR-4 affecte leur activation. PAR-3 sert de co-facteur pour PAR-4. L'activation des plaquettes est une des fonctions appartenant à PAR-4 (HOLLENBERG, 2003).

#### **4.1 Structure et fonctions de PAR-2**

Les gènes humains encodant PAR-1 et PAR-2 sont localisés dans le chromosome 5q13 et ces gènes sont séparés seulement par 90 kb. Le gène de PAR-3 est également situé dans le chromosome 5q13. Cependant, le gène de PAR-4 est localisé dans le

chromosome 19p12, mais partage tout de même une structure commune avec les autres gènes de PAR (AL-ANI *et al.*, 1999; KAHN *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998). PAR-2 est une protéine de 397 résidus d'acides aminés et possède une séquence identique à 83 % avec celle de PAR-2 de souris et une séquence identique à 35 % avec celle de PAR-1 humain. La partie N-terminale extracellulaire est la région la moins conservée entre PAR2 humain et de souris avec 65 % d'identité. Une autre région contenant une séquence de grande similarité entre l'humain et la souris est la partie située immédiatement du côté N-terminale du premier domaine transmembranaire I. Cette partie est importante pour la liaison avec le ligand (BAHOU *et al.*, 1994). PAR-1 possède une séquence chargée négativement (WEDEEKNES) au niveau N-terminal et distincte de la séquence permettant le clivage par la thrombine. Cette séquence augmente l'affinité pour la liaison avec la thrombine (VU *et al.*, 1991). Contrairement à PAR-1 et PAR-3, PAR-2 ne possède pas cette séquence chargée négativement. La présence de cette séquence peut expliquer la sélectivité de la thrombine pour cliver PAR-1 et PAR3 et non pas PAR2. La portion N-terminale de PAR-2 est plus courte que celle de PAR-1 de 29 acides aminés et ne possède pas de domaine de liaison à la thrombine. En effet, la région N-terminale de PAR-2 possède un site de clivage (SKGR/SLIG) qui peut être clivé par la trypsine, la tryptase des mastocytes, et les facteurs de coagulation Xa et VIIa. Ce clivage permet une exposition d'une séquence N-terminale NH<sub>2</sub>-SLIGRL (pour les souris) et NH<sub>2</sub>-SLIGKV (pour les humains) pouvant se lier à la deuxième boucle extracellulaire de PAR-2 pour activer celui-ci. Également, la partie N-terminale contient des sites consensus pour la glycosylation. La trypsine pancréatique est l'agoniste le plus puissant de PAR-2 et elle a

été détectée dans d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales (COCKS *et al.*, 1999; KOSHIKAWA *et al.*, 1998).

#### 4.2 Signalisation via PAR-2

Contrairement à PAR-1, il y a très peu d'études réalisées sur la signalisation de PAR-2. Les trois PAR (Par-1, PAR-2 et PAR-4) peuvent causer une élévation du calcium intracellulaire suite à leur activation et ce processus est médié par la protéine  $G_{q/11}$ . Il a été démontré que dans le cas de PAR-1, la deuxième boucle intracellulaire est responsable en grande partie pour le couplage avec la protéine  $G_q$  (VERRALL *et al.*, 1997). De plus, PAR-1 peut coupler avec la protéine  $G_i$  ce qui entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase et d'autres processus comme la régulation des canaux ioniques et l'activation de la phospholipase  $C\beta$  et de cSrc. Le couplage de PAR-1 avec soit la protéine  $G_q$ ,  $G_i$  ou les deux dépend du type cellulaire et de l'abondance des deux protéines (HUNG *et al.*, 1992; SWIFT *et al.*, 2000). Des études ont aussi suggéré que PAR-1 peut coupler avec les membres de la famille de  $G_{12/13}$  (OFFERMANN *et al.*, 1994). Jusqu'à présent, des études ont démontré une interaction de PAR-2 avec  $G_q/G_{11}$  et probablement avec  $G_0/G_i$ . Étant donné que PAR-2 interagit avec  $G_q/G_{11}$ , il a été suggéré que ce récepteur permet une activation de la PLC, la PKC et la voie des MAPK. En effet, la stimulation de PAR-2 par le peptide agoniste permet une activation de la PLC et la PKC dans les cellules neuronales et les cellules musculaires lisses (BERGER *et al.*, 2001; OKAMOTO *et al.*, 2001). L'activation de la PLC résulte en la formation de l'inositol

triphosphate et de diacylglycérol, ce qui entraînera la mobilisation du calcium intracellulaire et une activation de la PKC. Il a également été montré que l'activation de PAR-2 dans les kératinocytes permet de stimuler JNK et p38 MAPK (KANKE *et al.*, 2001). L'activation de PAR-2 permet aussi d'activer la voie des MAPK par l'activation de ERK1/2 et ainsi d'induire la transcription des gènes comme le VEGFR-2 et l'ADN primase 1 (DEFEA *et al.*, 2000). De plus, l'activation de RhoA par PAR-2 a été décrit pour les HUVEC. Ces études tendent à démontrer les rôles de PAR-2 dans différents phénomènes physiologiques tels la prolifération et la différenciation cellulaire. Il a également été démontré que l'activation de PAR-2 par la trypsine permet de stimuler le facteur de transcription NF- $\kappa$ B à se lier à l'ADN ainsi qu'une activation des kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (KANKE *et al.*, 2001).

### 4.3 Endocytose et Désensibilisation de PAR-2

La terminaison des réponses signalétiques engendrées par l'activation de PAR-2 est essentielle pour permettre une bonne régulation des activités physiologiques de PAR-2. Des études ont démontré récemment que les réponses cellulaires initiées par PAR-2 sont rapidement désensibilisées et son cheminement intracellulaire est similaire à celui de PAR-1. L'arrêt du signal engendré par PAR1 est régulé en partie par la phosphorylation du récepteur par le GRK. La sur-expression de GRK3 et GRK5 entraîne une augmentation de la phosphorylation de PAR-1 et cela inhibe l'accumulation de l'inositol phosphate. Des études ont suggéré que la partie C-terminale de PAR-1 est une cible pour la phosphorylation par les GRK et est responsable de l'arrêt du signal (ISHII *et al.*, 1994; NANEVICZ *et al.*, 1996). En effet, le mutant de PAR-1 dont tous les résidus de sérine et



thréonine ont été convertis en alanine possède une plus grande capacité de signalisation. Ce mutant démontre une réduction de la phosphorylation et n'est pas inhibé par la sur-expression de GRK. Toutefois, il a été démontré qu'il existe des mécanismes additionnels pour l'arrêt du signal initié par PAR-1. Par exemple, la liaison de PAR-1 avec la bêta-arrestine indépendamment de la phosphorylation du récepteur est suffisante pour induire une désensibilisation de celui-ci. De plus, la désensibilisation de PAR-1 est inhibée dans les cellules n'ayant pas de bêta-arrestine. Il a aussi été décrit que la phosphorylation de d'autres sites sur le récepteur joue un rôle important dans la régulation du signal de PAR-1. Le domaine C-terminale de PAR-2 contient plusieurs sites potentiels de phosphorylation. L'utilisation des inhibiteurs de PKC ont permis de démontrer que PKC possède une fonction dans la désensibilisation de PAR-2 (BOHM et al., 1996a). L'internalisation des récepteurs contribue à l'arrêt du signal en dissociant les récepteurs des protéines G et des effecteurs. Il a été démontré que PAR-2 utilise la voie d'internalisation par les puits de clathrines vers les endosomes pour être ensuite redistribué dans les lysosomes. Il est clair que la resensibilisation de PAR-2 implique la synthèse de nouveaux récepteurs et le trafic intracellulaire puisque cette resensibilisation est inhibée par l'action du cyclohexamide et de la brefeldin. Il a également été démontré que PAR-2 peut interagir avec la  $\beta$ -arrestine et la  $\beta$ 2-adaptine du complexe AP-2 pour son endocytose. L'importance de l'ubiquitination de PAR-2 dans son endocytose n'a pas été démontrée. Étant donné que l'utilisation du PAO a peu d'effet sur la mobilisation du calcium engendré par l'activation de PAR-2, cela démontre que l'endocytose n'est pas le mécanisme majeur de désensibilisation de ce récepteur.

#### 4.4 Rôles pro-inflammatoires de PAR-2

La tryptase sécrétée par les mastocytes peut activer PAR-2 dans les neurones, les cellules endothéliales et épithéliales. Étant donné que les mastocytes sont impliqués dans les phénomènes inflammatoires, dans les réactions d'hypersensibilité et dans la guérison des blessures, il est fort probable que le PAR-2 ait un rôle à jouer dans ces phénomènes (BIEDERMANN *et al.*, 2000; STEINHOFF *et al.*, 1999). De plus, la tryptase permet une augmentation de l'expression de IL-1 $\beta$  et une sécrétion de IL-8. Elle entraîne une hausse de la présence des molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM) et de la sélectine dans les cellules endothéliales. La tryptase est responsable de l'accumulation des neutrophiles et des éosinophiles. Elle produit une fuite vasculaire et elle est mitogénique pour les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (BROWN *et al.*, 1995a; BROWN *et al.*, 1995b; SHPACOVITCH *et al.*, 2002; VERGNOLLE, 1999). PAR-2 est fortement exprimé dans les organes vascularisés. Dans les vaisseaux sanguins, PAR-2 se retrouve au niveau de l'endothélium et dans les cellules du muscle lisse (BOHM *et al.*, 1996b; D'ANDREA *et al.*, 1998; NYSTEDT *et al.*, 1995). Les agents inflammatoires et les dommages au tissu entraînent une augmentation du niveau d'expression de PAR-2 dans les vaisseaux sanguins. En effet, le facteur alpha stimulateur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-1 (IL-1) et la lipopolysaccharide (LPS) provoquent la sur-expression de l'ARNm de PAR-2 et l'immunoréactivité des cellules HUVEC (human vascular endothelial cells) à l'intérieur de 4 à 20 heures suite à leurs exposition (NYSTEDT *et al.*, 1996). Étant donné que l'inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal permet la sécrétion de protéases pouvant activer PAR-2, il fût suggéré que ce récepteur joue un rôle important dans les processus inflammatoires au

niveau du tractus gatro-intestinal. En effet, l'administration de la trypsine, la tryptase et du peptide agoniste de PAR-2 au niveau du colon d'une souris entraîne une réaction inflammatoire généralisée chez les souris de type sauvage et non chez les souris déficientes en PAR-2. Dans un modèle de dermatite allergique, chez les souris déficientes en PAR-2, il y a une diminution de l'enflure des oreilles et une baisse de l'infiltration des cellules inflammatoires (KAWAGOE et al., 2002). Les activateurs de PAR-2 peuvent aussi envoyer des signaux aux neurones afférents primaires innervant la peau et cela engendre le relâchement des neuropeptides SP et CGRP induisant ainsi une inflammation neurogénique (KRISHNA et al., 2001). L'activation de PAR-2 permet aussi d'activer la voie de NF- $\kappa$ B dans les kératinocytes et les myocytes, démontrant l'importance de PAR-2 au niveau de l'inflammation. L'agoniste de PAR-2 entraîne une augmentation de l'expression de l'ARN de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) chez les kératinocytes ainsi que l'expression de IL-8 chez les cellules épithéliales endométriales et les cellules stromales (HIROTA *et al.*, 2005). L'activation de ce récepteur stimule la sécrétion de IL-1 $\beta$ , IL-8 et IL-6 chez les neutrophiles (SHPACOVITCH et al., 2004). De plus, la stimulation de PAR-2 avec son peptide agoniste résulte en l'activation de certaines protéines kinases activées lors d'un stress cellulaire (JNK et p38) (BRETSCHNEIDER et al., 1999; KANKE et al., 2001). Au niveau des voies respiratoires, PAR-2 peut avoir des rôles pro et anti-inflammatoires. PAR-1, PAR-2 et PAR-4 sont exprimés par les cellules épithéliales des voies respiratoires et l'activation de ces récepteurs entraîne le relâchement des cytokines comme IL-6, IL-8 et la prostaglandine E<sub>2</sub> qui sont des médiateurs pouvant réguler l'inflammation (ASOKANANTHAN et al., 2002). De plus, l'activation de PAR-2 entraîne une

augmentation de la perméabilité vasculaire, une relaxation des vaisseaux sanguins, une hypotension systémique, l'infiltration des granulocytes et l'adhésion des leucocytes. (AL-ANI et al., 1999; DAMIANO et al., 1996; HWA et al., 1996; KAWABATA et al., 1998; SAIFEDDINE et al., 1996; VERGNOLLE, 1999; VERGNOLLE et al., 1999; VERGNOLLE et al., 1998) Il a été confirmé que PAR-2 possède une activité de régulation de la douleur lors des processus inflammatoires. Des chercheurs ont détecté la présence de PAR-2 au niveau des nerfs sensitifs et l'activation de ces récepteurs avait pour effet une mobilisation du calcium intracellulaire. L'identification de PAR-2 au niveau des neurones a attiré l'attention des chercheurs sur le rôle de PAR-2 dans la nociception. Il a été déterminé que l'activation de PAR-2 permet de mobiliser le calcium intracellulaire dans les neurones.

#### **4.5 Rôles anti-inflammatoires de PAR-2**

Il a été démontré dans des études récentes que PAR-2 peut aussi jouer des rôles anti-inflammatoires. En effet, l'activation de PAR-2 avec son peptide agoniste offre une protection contre l'inflammation du colon en diminuant les cytokines et les protéines des cellules de type T et en inhibant l'activité myeloperoxydase (FIORUCCI et al., 2001). Le pré-traitement avec l'agoniste de PAR-2 permet également la prévention des lésions gastriques induite par l'administration sous-cutanée d'indométhacine ou par l'administration par voie orale d'une solution contenant 60% d'éthanol et 150 mM de HCl. Cette protection est due au fait que la stimulation de PAR-2 entraîne la sécrétion des mucus gastriques en activant la relâche du CGRP et des tachykinines provenant des neurones sensorielles (KAWABATA et al., 2001). PAR-2 est impliqué dans la protection

contre les lésions suite à une réperfusion. Des chercheurs ont démontré que l'infusion du peptide agoniste de PAR-2 permet un rétablissement fonctionnel du myocarde et une baisse de la peroxydation lipidique lors du flux sanguin (NAPOLI et al., 2000). Il a été démontré que l'injection du peptide agoniste de PAR-2 chez les souris diminue la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-12 et l'interféron- $\gamma$ ) (FIORUCCI et al., 2001). Dépendamment de l'environnement physiologique ou pathophysiologique, PAR-2 peut être impliqué dans les processus pro ou anti-inflammatoires.

#### **4.6 Autres fonctions de PAR-2**

PAR-2 possède plusieurs fonctions physiologiques et est notamment impliqué dans les processus de la prolifération cellulaire. En effet, la stimulation de PAR-2 avec la trypsine entraîne la prolifération des cellules cancéreuses du colon (DARMOUL et al., 2004). L'activation de PAR-2 permet la stimulation de l'angiogénèse dans un modèle d'ischémie du membre postérieur chez la souris (MILIA et al., 2002). Beaucoup d'études ont été effectuées jusqu'à présent sur PAR-1, mais de plus en plus de chercheurs s'intéressent à PAR-2 en raison de ses fonctions dans la prolifération cellulaire et l'angiogénèse. L'expression de PAR-2 au niveau des cellules endothéliales et du muscle lisse suggère que ce récepteur a un rôle à jouer dans la régulation du tonus vasculaire. L'effet prédominant des agonistes de PAR-2 au niveau vasculaire est l'induction de la relaxation des vaisseaux sanguins. Dans des préparations isolées d'aorte de rat et d'artère coronaire humaine et de porc, l'activation de PAR-2 avec la trypsine et son peptide agoniste cause une relaxation dépendante de l'endothélium (AL-ANI et al., 1995; HAMILTON et al., 1998; HWA et al., 1996; ROY et al., 1998). Les mécanismes de

relaxation artérielle impliquent la mobilisation du calcium et l'activation de l'oxide nitrique synthase dans les cellules endothéliales. La formation et la relâche de l'oxide nitrique provoquent la relaxation des vaisseaux du muscle lisse. Le récepteur de l'endothéline B est aussi un médiateur des effets cardiovasculaires des agonistes de PAR-2 (MAGAZINE et al., 1996). Même si l'effet majeur de l'activation de PAR-2 est la relaxation vasculaire, il a été démontré au niveau des artères rénales isolés de souris que la trypsin et le peptide agoniste de PAR-2 entraînent une vasoconstriction lorsque l'endothélium est enlevé ou lorsque les inhibiteurs de l'oxide nitrique synthase sont utilisés (MOFFATT & COCKS, 1998). Dans l'artère pulmonaire de rat, de faibles concentrations du peptide agoniste de PAR-2 induisent une relaxation qui est dépendante de l'endothélium tandis que de fortes concentrations de ce peptide entraînent une vasoconstriction. Cette contraction est indépendante de l'endothéline, de l'angiotensine, de la noradrénaline ou des métabolites de l'acide arachidonique (ROY et al., 1998).

#### 4.6.1 Rôles de PAR-2 dans la coagulation

La coagulation peut être engendrée par deux processus : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est initiée par un dommage tissulaire et requiert le facteur tissulaire (TF) ou thromboplastine exprimé par les cellules endothéliales et les monocytes lors de l'inflammation. Lors de la coagulation, le facteur tissulaire lie le facteur VIIa et le complexe TF/FVIIa interagit avec le facteur X pour activer celui-ci et formant le facteur Xa. Le facteur Xa se lie alors avec le facteur Va pour induire la conversion de la prothrombine en thrombine. La thrombine permet la conversion de la fibrinogène en fibrine et permet aussi d'activer les PAR pour induire l'aggrégation des

plaquettes (ALLEN *et al.*, 2000; CAMERER *et al.*, 1996; KJALKE *et al.*, 1998). La voie intrinsèque est déclenchée par le contact du sang avec le collagène lors d'un dommage à l'endothélium et commence par la conversion du facteur XII en facteur XIIa, un processus catalysé par la kallicréine et les kininogènes. La conversion de ce facteur engendre une cascade d'événement permettant l'activation du facteur XI et du facteur V. La voie intrinsèque converge alors avec la voie extrinsèque pour mener à la conversion de la prothrombine en thrombine, un processus dépendant du facteur Xa (DAVIE & RATNOFF, 1964; HOFFMAN, 2003; SCOTT *et al.*, 1985). Les facteurs VIIa et Xa peuvent également se lier aux PAR pour les activer.

## **II. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**



**L'hypothèse :**

Plusieurs études ont montré que les récepteurs nucléaires transmembranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, comme les récepteurs des prostanoïdes et du facteur activant les plaquettes ont des fonctions de transcription de gènes, tandis que les récepteurs au niveau de la membrane plasmique semblent plutôt induire des effets aigus indépendants de transcription de gènes.

Nous proposons qu'il existe deux populations de PAR-2 dont une se retrouvant à la membrane plasmique et l'autre au niveau de la membrane nucléaire. La population se trouvant au niveau de la membrane nucléaire proviendrait de la translocation de PAR-2 situé à la membrane plasmique. Ces deux populations de PAR-2 joueraient des rôles différents dans les processus inflammatoires étant donné leur localisation différente dans la cellule.

**Les objectifs sont :**

1. Déterminer le cheminement intracellulaire de PAR-2 suite à sa stimulation dans les cellules BOSC (épithéliales rénales embryonnaires humaines).
2. Étudier les propriétés de PAR-2 à la membrane plasmique et PAR-2 à la membrane nucléaire dans la régulation des gènes pro-inflammatoires dans les cellules BOSC.
3. Élucider les mécanismes signalétiques des deux populations de PAR-2 dans la transcription des gènes pro-inflammatoires.

### **III. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel*

La trypsine (L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated) a été obtenue de Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ). L'anticorps monoclonal anti-PAR2 de souris provient de Santa Cruz (Santa Cruz, CA). L'anticorps monoclonal anti- $\beta$ -Actine de souris [C-15] provient de Abcam (Cambridge, MA). Les anticorps anti-souris IgG conjugués à la peroxidase Horseradish ont été obtenus de Pierce (Rockford, IL). Le peptide/agoniste PAR2 de souris, SLIGRL (PAR2-AP) a été synthétisé par Bio Synthesis Inc. (Lewisville, Texas).

### *Culture cellulaire*

Les cellules BOSC sont des cellules épithéliales rénales embryonnaires humaines (American Type Culture Collection; Manassas, VA) et sont mises en culture dans un milieu DMEM comprenant 10 % FBS et 1% du mélange d'antibiotique contenant la pénicilline (100 unités/mL) et la streptomycine (100  $\mu$ g/mL). Le passage des cellules se fait lorsqu'elles ont atteint environ 80 % de confluence.

### *Isolation des noyaux cellulaires*

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec 10 mL de PBS froid et recueillies dans un tube de 15 mL. Les cellules sont centrifugées à 1400 rpm pendant 5 minutes à

4°C. La resuspension des cellules se fait avec un tampon de lyse contenant 10 mM de TrisHCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM sucrose et des inhibiteurs de protéase. Les cellules sont broyées grâce à un mortier et un pilon en verre. L'homogénat est centrifugé à 700 g pendant 10 minutes à 4°C afin d'isoler les noyaux dans le culot. Les noyaux sont lavés avec le tampon de lyse contenant 0.1 % NP-40 et centrifugés à 700 g pendant 10 minutes à 4°C. Les mitochondries sont obtenues en centrifugeant le surnageant à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C et la membrane plasmique est isolée en centrifugeant à 120 000 g pendant 60 minutes à 4°C.

#### *Western blot*

Les cellules BOSC transfectées avec PAR-2 GFP sont lysées avec la solution de lyse contenant 150 mM NaCl, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Phosphate sodium, pH 7.0, 1% Triton X-100, et un cocktail inhibiteur de protéase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). 30 µg de chaque échantillon est mélangé avec du 4 x Reducing Sample Buffer (Boston BioProducts Inc, Worcester, MA). Après l'ébullition et le refroidissement des échantillons, ceux-ci sont mis sur un gel SDS-PAGE 10 %. La migration des protéines se fait sous un ampérage de 25 mA et dans un tampon contenant 25 mM Tris, 192 mM glycine et 3.5 mM SDS. Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (PerkinElmer; Boston, MA) à 100 volts pour deux heures ou 30 volts pour 24 heures à 4°C dans un tampon contenant 25 mM Tris, 192 mM glycine et 20% methanol. Les protéines non-spécifiques sont bloquées en incubant la membrane avec du lait 5 % (ICN; Aurora, OH) dilué dans du tampon TBS-T (10 mM tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl et 0.05% tween-20) pendant 30 minutes. L'anticorps primaire anti-PAR2 est

dilué 250 fois avec du lait 1,5 % dilué dans du tampon TBS-T et incubé pendant 3 heures à la température de la pièce ou 24 heures à 4°C. L'anticorps pour les lamines A/C est dilué 30 fois. La dilution de l'anticorps contre le cytochrome C est de 250 fois et celle contre le CD-51 est aussi de 250 fois. L'anticorps pour la  $\beta$ -actine est dilué 10000 fois. La réaction avec l'anticorps secondaire se fait avec un anticorps anti-souris IgG conjugué à la peroxidase Horseradish dilué 5000 fois dans du lait 1,5% TBS-T pendant une heure à la température de la pièce. Les protéines spécifiques sont révélées avec un agent chemiluminescent (PerkinElmer Lifer Sciences, Boston, MA) et exposées sur un film à rayon X.

#### *RT-PCR*

L'ARN total est isolé à l'aide de la solution de Trizol (Invitrogen, Carisbad, CA). Pour la réaction de transcription réverse, 5  $\mu$ g de l'ARN total est chauffé à 70 °C pendant 10 minutes. Après refroidissement sur glace, l'ARN est mis dans une solution de réaction avec 13.3 U/ $\mu$ L de M-MLV (enzyme pour la transcription réverse provenant d'Invitrogen, Carisbad, CA), 10 mM DDT, 0.129 U/ $\mu$ L RNAguard TM Rnase Inhibitor (Amersham, Piscataway, NJ), 0.67 mM dNTP, 16.7  $\mu$ g/mL d'oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA) et une solution tampon First Strand 1x dans un volume total de 30  $\mu$ L et incubé à 42 °C pendant 60 minutes. Après inactivation de l'enzyme en incubant à 94 °C pendant 5 minutes, l'ADN est conservé à -80 °C. Les oligonucléotides pour ICAM1, IL-1, IL-6 et EDG2 ont été conçus à l'aide du programme Primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). La séquence de l'oligonucléotide sense pour ICAM1 est 5'GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC<sup>3'</sup> et la séquence anti-sense est

5'ACTGTGGGGTTCAACCTCTG<sup>3'</sup>. La séquence de l'oligonucléotide sense pour IL-1 est 5'AATGACGCCCTCAATCAAAG<sup>3'</sup> et la séquence anti-sense est 5'TGGGTATCTCAGGCATCTCC<sup>3'</sup>. La séquence de l'oligonucléotide sense pour IL-6 est 5'TACCCCCAGGAGAAGATTCC<sup>3'</sup> et la séquence anti-sense est 5'TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT<sup>3'</sup>. La séquence de l'oligonucléotide sense pour IL-8 est 5'CTGCGCCAACACAGAAATTA<sup>3'</sup> et la séquence anti-sense est 5'ATTGCATCTGGCAACCCTAC<sup>3'</sup>. La séquence de l'oligonucléotide sense pour EDG2 est 5'ATTTCACAGCCCCAGTTCAC<sup>3'</sup> et la séquence anti-sense est 5'CTGTAGAGGGGTGCCATGTT<sup>3'</sup>. Les oligonucléotides QuantumRNA™ universal 18S Standard (Ambion, Austin, TX) sont utilisés comme référence. Le cycle de PCR est de 94 °C pendant 15 secondes, 72 °C pendant 30 secondes et est répété 30 fois.

### *Immunofluorescence*

Les cellules sont déposées dans des plats de 24 puits contenant des lamelles et sont transfectées avec le plasmide approprié. 24 heures suite à la transfection, les cellules sont mises dans un milieu faible en nutriment (DMEM 1% FBS) pendant 24 heures. Suite à leur stimulation, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à la température de la pièce. Les cellules sont bloquées avec une solution de blocage contenant du PBS, 5 % de sérum de veau foetal, 5 % de sérum de chèvre et 0,02 % azide de sodium pendant 45 minutes. La perméabilisation des cellules se fait avec le Triton X-100 10 % dilué dans la solution de blocage. Les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-PAR2 (1 :100) dilué dans la solution de blocage pendant 60 minutes à la température de la pièce. L'incubation avec l'anticorps secondaire anti-mouse (1 :500)

dilué dans la solution de blocage est une durée de 60 minutes à la température de la pièce.

La coloration des noyaux se fait à l'aide du PI (1 :3500) ou du DAPI (1 :1000) dilué dans la solution de blocage pendant 5 minutes à la température de la pièce.



#### **IV. RÉSULTATS**

Afin de visualiser la translocation du récepteur PAR-2 et pour déterminer vers quelle structure intracellulaire PAR-2 est internalisé, nous avons utilisé les techniques de la microscopie à fluorescence et de la microscopie confocale. Les cellules BOSC ont été transfectées avec PAR-2 couplé au GFP. Dans son état inactif, le récepteur se retrouve majoritairement à la membrane plasmique et suite à sa stimulation avec la trypsine 100 nM ou son peptide agoniste SLIGKV 200  $\mu$ M, PAR-2 est transloqué dans les endosomes et dans une région périnucléaire (Figure 1). Le marquage des noyaux nous montre que PAR-2 co-localise avec la membrane périnucléaire, ce qui tend à montrer que PAR-2 est transloqué vers la membrane périnucléaire suite à sa stimulation. La translocation de PAR-2 de la membrane plasmique vers la région périnucléaire a été observée dans d'autres types cellulaires notamment les cellules HEK293 et KNRK (données non montrées).

Nous avons aussi utilisé la technique de Western Blot afin de déterminer la présence de PAR-2 au niveau de la membrane plasmique et au niveau du noyau suite à la stimulation du récepteur (Figure 2). La présence de PAR-2 dans nos fractions est détectée par l'utilisation des anticorps contre PAR-2. Nous observons que PAR-2 se retrouve essentiellement au niveau de la membrane plasmique et un peu dans la fraction nucléaire dans son état inactif. Suite à la stimulation du récepteur par la trypsine 100 nM pendant 60 minutes, le récepteur se retrouve en grande quantité dans la fraction nucléaire et en plus faible concentration dans la fraction contenant la membrane plasmique (Figure 2).

Cela confirme donc que la stimulation du récepteur par la trypsine entraîne la translocation du récepteur de la membrane plasmique vers la membrane nucléaire.

Afin de déterminer la pureté de nos fractions nucléaires, nous avons isolé les noyaux des cellules BOSC en les broyant grâce à un mortier et un pilon en verre et en procédant à plusieurs étapes de centrifugation. Nous avons utilisé la technique de western Blot pour marquer les composants correspondant aux différentes fractions. L'utilisation des anticorps contre les lamines A/C qui sont des protéines ubiquitaires de la famille des filaments intermédiaires et qui polymérisent entre la membrane nucléaire interne et la chromatine nous permet de déterminer la présence de noyaux dans nos fractions. Nous pouvons observer que la fraction nucléaire est marquée de façon intense avec l'utilisation des anticorps contre les lamines A/C tandis que la fraction non-nucléaire est marquée de façon minime. La présence de mitochondrie est détectée avec l'anticorps contre le cytochrome C et les résultats nous montrent que la fraction nucléaire n'est pas contaminée par les mitochondries et seule la fraction non-nucléaire contient les mitochondries. Le marquage des fractions avec l'anticorps contre le CD-51 nous permet de détecter la présence de la membrane plasmique. En effet, le CD-51 qui est aussi connu sous le nom de la chaîne alpha du récepteur de la vitronectine (VNR) est constitué d'une sous-unité de 125 kDa et d'une petite sous-unité de 25 kDa et est associé de manière non-covalente à la chaîne  $\beta 3$  du VNR qui elle-même est identique à GPIIIa (molécule CD61). Le VNR est responsable de l'adhésion cellulaire grâce à la séquence A-G-A contenue dans la vitronectine, dans le facteur de Willebrand, le fibrinogène et la thrombospondine.

Seule la fraction non-nucléaire est marquée par l'utilisation de l'anticorps CD-51 (Figure 3).

Étant donné que PAR2 se retrouve de façon majoritaire au niveau de la membrane plasmique et en faible quantité au niveau de la membrane nucléaire dans son état inactif, nous avons voulu déterminer les différences de fonction de ces récepteurs localisés dans des emplacements cellulaires différents. Puisque PAR-2 joue un rôle important dans les processus inflammatoires, nous avons analysé l'expression de certains gènes impliqués dans l'inflammation suite à l'activation de PAR-2. La stimulation de PAR-2 au niveau de la cellule intacte pendant 15 minutes nous montre une augmentation de l'expression de l'ARNm de IL-1 tandis que l'expression des autres gènes ne varie pas et ce jusqu'à 60 minutes de stimulation (Figure 4 et 8). L'activation de PAR-2 à la surface cellulaire pendant trois heures nous montre un retour du niveau d'expression de IL-1 à un niveau basal. L'expression des autres gènes demeure inchangée (Figure 5 et 8).

Afin d'évaluer le rôle de PAR-2 au niveau de la membrane nucléaire, nous avons isolé les noyaux et évalué la présence du récepteur à l'aide de la technique de western blot. La pureté des différentes fractions a aussi été évaluée par western blot. Nous avons pu observer que PAR-2 se retrouve au niveau de la membrane nucléaire de façon endogène. Dans le but d'étudier le rôle de PAR-2 au niveau de la membrane nucléaire dans l'inflammation, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans les processus inflammatoires. Nous avons isolé les noyaux cellulaires et nous avons activé PAR-2 avec son peptide agoniste pendant 15 à 60 minutes dépendamment des gènes.

Nous constatons que l'activation de PAR-2 au niveau de la membrane nucléaire entraîne une augmentation de l'expression de ICAM-1, IL-1, IL-8 et l'expression du récepteur de LPA1 ne change pas (EDG2) (Figure 6 et 9). Nous avons également examiné l'expression de ces gènes suite à l'activation de PAR-2 en fonction du temps jusqu'à trois heures après la stimulation du récepteur. Nous avons observé que le niveau maximal d'expression des gènes se situe entre 15 à 60 minutes d'activation de PAR-2 dépendamment des gènes (Figure 8 et 9). La stimulation de PAR-2 pendant 3 heures de temps entraîne une diminution de l'expression des gènes de ICAM-1, IL-1 et du récepteur de LPA1 à un niveau inférieur à celui du récepteur inactif. L'activation de PAR-2 au niveau de la membrane nucléaire après trois heures entraîne une baisse de l'expression du gène de IL-8 jusqu'à un niveau basal (Figure 7 et 9).

Afin d'évaluer les voies de signalisation impliquées dans l'activation des gènes suite à la stimulation de PAR-2 au niveau de la membrane plasmique et au niveau de la membrane nucléaire, nous avons utilisé une panoplie d'inhibiteurs dont les inhibiteurs de ERK1/2, p38 et JNK. Puisque l'activation de PAR-2 au niveau de la membrane plasmique permet d'augmenter l'expression de l'ARNm de IL-1 seulement, nous avons analysé l'effet des inhibiteurs sur l'expression de ce gène. Au niveau de la membrane plasmique, nous observons que l'inhibiteur de ERK1/2 (PD98059 10 uM) permet une inhibition de l'augmentation de l'ARNm de IL-1 suite à l'activation de PAR-2 (Figure 10). En ce qui concerne PAR-2 au niveau de la membrane nucléaire, l'augmentation de l'expression de IL-1 après l'activation de PAR-2 est inhibée par l'utilisation de l'inhibiteur de p38 (SB203580 30 uM) (Figure 11).

## **V. DISCUSSION**

Les récepteurs couplés aux protéines G forment la famille la plus grande et la plus diverse des familles de récepteurs membranaires. Des études ont identifié plus de 600 RCPG dans le génome humain et ils sont la cible d'environ 50 % des médicaments sur le marché. De plus, ils représentent le principal centre d'intérêt des programmes étudiant les fonctions génomiques et de la recherche dans le développement des médicaments.

Les récepteurs activés par protéases font partie de la famille des RCPG. PAR-2 est de plus en plus étudié car il est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques et pathophysiologiques. Étant donné que l'activation du récepteur est engendrée par le clivage de la partie N-terminale du récepteur, le récepteur ne peut plus être activé de nouveau et la re-sensibilisation du récepteur se fait seulement par la synthèse de nouveaux récepteurs. Il a été démontré que PAR-2 est internalisé après son activation et que celui-ci emprunte ensuite une voie de dégradation dans les lysosomes. Cependant, les résultats de cette étude tendent à démontrer qu'il existe une nouvelle voie d'internalisation pour PAR-2. De plus, nous avons observé qu'il existe de façon endogène des populations de PAR2 au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'au niveau de la membrane nucléaire. La quantité de récepteurs se trouvant à la membrane nucléaire est très faible comparativement à ceux situés à la membrane plasmique. Nous avons démontré que PAR-2 situé à la membrane plasmique est internalisé dans des vésicules et est transloqué au niveau de la membrane périnucléaire suite à sa stimulation avec la trypsine ou son peptide agoniste SLIGRL. Cette translocation se fait rapidement et est complète à l'intérieur d'une heure après la stimulation du récepteur. Les mécanismes permettant la translocation de PAR-2 de la membrane plasmique à la membrane nucléaire ne sont pas encore connus et aucune séquence signal de localisation

nucléaire (NLS) connue n'a été identifiée par l'analyse de la séquence du gène de PAR-2. Cependant, pour d'autres types de récepteur qui se transloquent à la membrane nucléaire suite à leur stimulation, des séquence NLS ont été identifiées. C'est le cas pour les récepteurs du facteur activateur de plaquette, muscarinique de l'acétylcholine M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>5A</sub>, et de l'angiotensine II (AT<sub>1</sub>) (BONNER *et al.*, 1988; CHASE *et al.*, 1993; LU *et al.*, 1998). Donc, PAR-2 semble utiliser deux voies d'endocytose de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires suite à sa stimulation. Il est possible que ces deux voies soient utilisées en même temps par deux populations du récepteur. Une partie des récepteurs serait dégradée suite à leur stimulation et une autre partie serait transloquée vers la membrane nucléaire afin de jouer un rôle probable dans l'induction de certains gènes nécessaires pour la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et l'inflammation. La découverte de ce nouveau phénomène pour l'internalisation d'un récepteur et la présence des récepteurs à la membrane plasmique ainsi qu'à la membrane nucléaire nous ont poussé à déterminer les différences de fonction entre les récepteurs au niveau de la membrane plasmique et ceux au niveau de la membrane nucléaire. Étant donné que la composition en protéines, enzymes et autres molécules est différente selon la localisation cellulaire, nous croyons qu'il y a des différences de fonction entre PAR2 situé à la membrane plasmique et PAR2 retrouvé à la membrane nucléaire. Ces différences de fonction sont probablement dues au fait que ces deux populations de récepteurs couplent avec différents médiateurs intracellulaires et les signaux engendrés par ces récepteurs diffèrent.



Nous avons démontré que la stimulation de PAR2 à court terme avec son peptide agoniste sur des cellules BOSC intactes permet une sur-expression du gène pro-inflammatoire IL-1 tandis que l'expression de ICAM-1, IL-6, IL-8 et du récepteur de LPA1 (EDG2) demeure inchangée. L'utilisation du peptide agoniste permet d'activer seulement les récepteurs à la membrane plasmique étant donné que ce peptide ne passe pas à travers la membrane lipidique. L'augmentation de l'expression du gène de IL-1 se fait rapidement et atteint un niveau maximal après 15 minutes. Après trois heures de stimulation du récepteur situé à la membrane plasmique avec son peptide agoniste, l'expression des gènes est diminuée pour atteindre son niveau basal. L'isolement des noyaux cellulaires et la stimulation de PAR2 au niveau de la membrane nucléaire nous montrent que ces récepteurs régulent l'expression des gènes pro-inflammatoires de façon différente des récepteurs au niveau de la membrane plasmique. De façon similaire à PAR2 à la surface cellulaire, l'activation de PAR2 nucléaire entraîne une augmentation de l'expression de IL-1. De façon surprenante, la stimulation de PAR-2 après isolement des noyaux nous montre aussi une augmentation de l'expression de l'ARNm de ICAM-1 et IL-8. Cependant, l'expression de IL-6 et EDG2 ne change pas. Toutefois, après une stimulation de PAR-2 sur des noyaux isolés pendant 3 heures, l'expression de l'ARNm de ICAM-1, IL-1 et EDG2 diminue et leur niveau d'expression est moindre comparativement à celui du récepteur inactif. L'activation de PAR-2 situé à la membrane nucléaire pendant trois heures provoque un retour au niveau basal de l'expression de l'ARNm de IL-8.

La membrane nucléaire et le nucléoplasme contiennent des facteurs permettant la transduction des signaux des récepteurs comme les protéine G, les phospholypases A<sub>2</sub>, D et C, les canaux ioniques, les canaux calciques, l'adénylate cyclase et PKC (BARSONY & MARX, 1990; BUCHNER, 1995; D'SANTOS *et al.*, 1998; LONGIN *et al.*, 1997; MALVIYA & ROGUE, 1998). D'autres facteurs comme le facteur nucléaire kappa B (NF-κB) et les MAP kinases (CHENG *et al.*, 1996; HUNOT *et al.*, 1997; KIM & KAHN, 1997). La signalisation intracellulaire de PAR2 est médiée par les protéines G<sub>αq/11</sub> qui vont ensuite activer la PLC et la cascade des MAPK. Il est connu que l'activation de la PLC entraîne une augmentation du niveau de calcium intracellulaire. La stimulation de PAR2 entraîne une activation de la cascade des MAPK permettant ainsi une activation de ERK1/2. Afin de déterminer quels sont les médiateurs responsables de l'expression des gènes pro-inflammatoire dans notre étude, nous avons utilisé des inhibiteurs de ERK1/2 (PD98059), p38 (SB203580) et JNK (SP600125). Nous avons analysé l'effet de ces inhibiteurs sur l'expression de l'ARNm de IL-1 étant donné que l'activation de PAR-2 au niveau de la membrane plasmique permet seulement d'augmenter l'expression de IL-1. Lors de la stimulation de PAR2 au niveau de la cellule intacte, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de IL-1 est inhibée par l'utilisation de l'inhibiteur de ERK1/2. La stimulation de PAR2 au niveau de la membrane nucléaire et l'utilisation des différents inhibiteurs nous montrent que l'expression des gènes suite à l'activation du récepteur n'est pas dépendant de ERK1/2 ou JNK, mais bien de p38. Il y a donc une différence dans la signalisation pour l'activation de la transcription des gènes entre la population de PAR2 se trouvant à la membrane plasmique et celle situé à la membrane nucléaire. La translocation de PAR2 de la membrane plasmique jusqu'à la membrane nucléaire est

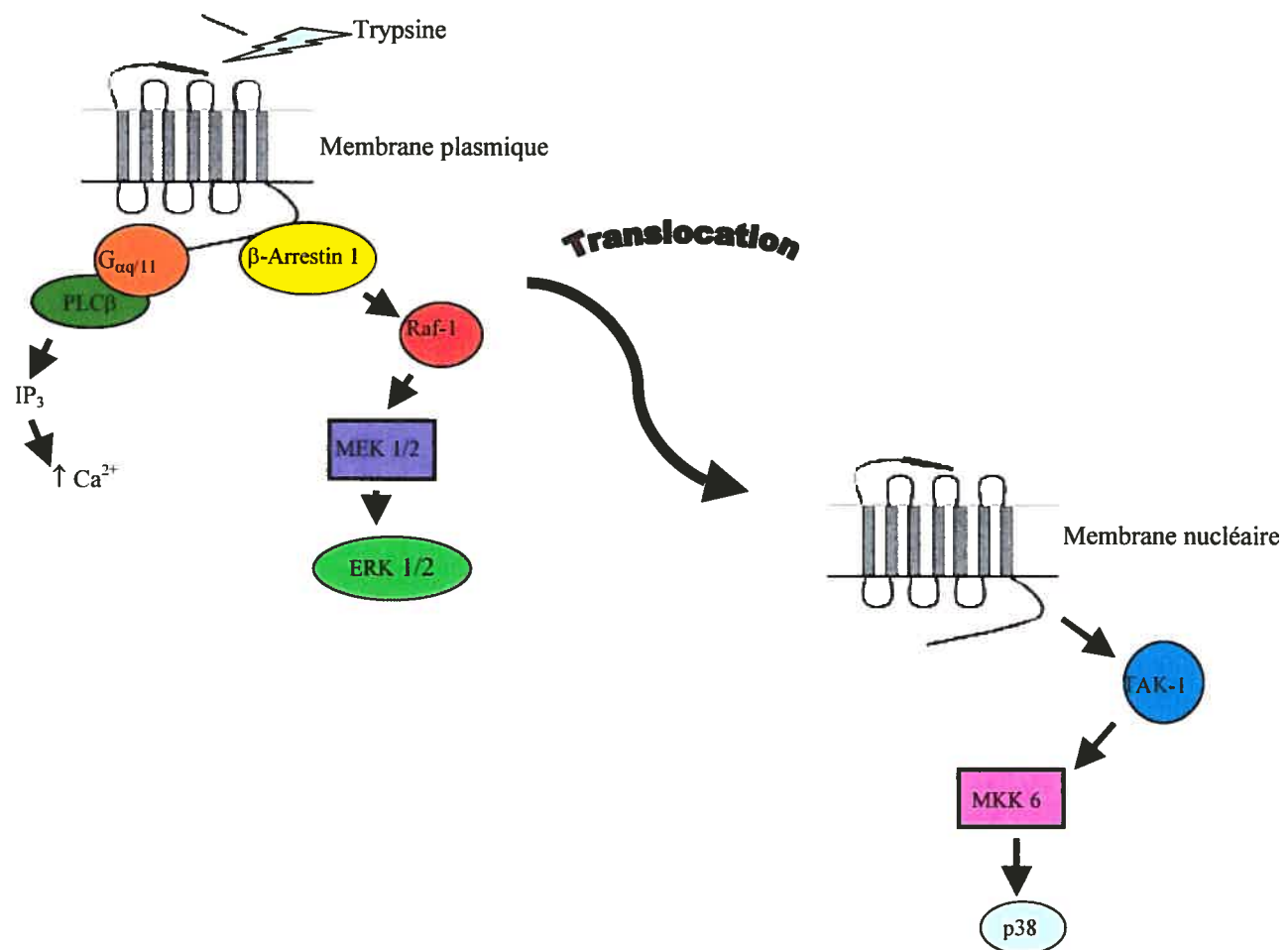
peut-être un moyen pour la cellule de modifier le niveau d'expression d'un certain gène ou d'amplifier le signal régulé par PAR2 au niveau de la membrane nucléaire. Cette étude démontre qu'un même récepteur peut réguler l'expression des gènes de façon différente selon sa localisation intracellulaire étant donné qu'il va coupler avec différents médiateurs suite à son activation. En effet, l'activation de PAR2 à la surface cellulaire va induire une activation de la protéine  $G_q/G_{11}$  et une activation de la PLC pour permettre une augmentation du niveau de calcium intracellulaire. La stimulation de PAR2 à la membrane plasmique va aussi entraîner une activation de la cascade des MAPK dont une activation de ERK1/2 pour ensuite induire la transcription des gènes. Les mécanismes de signalisation intracellulaire induits par la population de PAR2 au niveau de la membrane nucléaire ne sont pas encore bien caractérisés. Il est possible que l'expression des différents gènes passe par des mécanismes de signalisation intracellulaire différents. Dans notre étude, l'expression des gènes pro-inflammatoire induite par l'activation de PAR2 nucléaire n'est pas dépendante de ERK1/2 ou JNK, mais elle est dépendante de p38 MAPK. Ces récepteurs utilisent un mécanisme signalétique différent de ceux localisés à la membrane plasmique étant donné de la présence ou de l'absence de différents médiateurs ou seconds messagers permettant l'activation de la transcription des gènes (schéma 1).

Même si d'autres études ont démontré qu'il existe des RCPG au niveau de la membrane nucléaire, la présence de PAR-2 n'a pas été montrée. Notre étude démontre que PAR-2 est retrouvé au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'au niveau de la membrane nucléaire de façon endogène et que la stimulation de PAR-2 permet sa

translocation jusqu'à la membrane nucléaire. Les mécanismes impliqués dans la translocation ne sont pas connus, mais pourraient impliquer les NLS non encore identifiés. Il n'y a plus de doute que PAR-2 est un important régulateur durant l'inflammation et la réponse immunitaire. Les études tendent à démontrer que les protéases à sérine agissent comme des médiateurs autocrine, paracrine ou endocrine. Un bon nombre de ces protéases permettent une activation des récepteurs activés par protéase et l'activation de ces récepteurs engendre un signal de transduction impliqué dans la réponse inflammatoire et immunitaire. PAR-2 semble donc avoir un rôle essentiel puisqu'il permet l'activation de plusieurs médiateurs inflammatoires et des cytokines. En effet, nous avons démontré dans notre étude que l'activation de PAR-2 permet l'induction des gènes pro-inflammatoires dont ICAM-1, IL-1 et IL-8. Il faut noter que l'augmentation de l'expression de ces gènes se fait dans un délai très court, c'est-à-dire à l'intérieur d'environ une heure. L'expression de ces gènes est diminuée jusqu'à un niveau basal ou inférieur au niveau basal après trois heures suite à la stimulation de PAR-2. PAR-2 semble donc jouer un rôle au niveau de l'inflammation aiguë et qu'il joue un rôle anti-inflammatoire à long terme. D'autres études ont démontré que ce récepteur peut avoir une fonction pro ou anti-inflammatoire. Cependant, plusieurs questions restent sans réponse. En effet, nous ne savons pas encore exactement quelles sont les protéases endogènes qui activent PAR-2 dans l'inflammation au niveau *in vivo*. Nous ne connaissons pas encore quelles sont les voies signalétiques spécifiques et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de PAR-2 dans différents états inflammatoires et tissulaires. Des études plus poussées nous permettraient de répondre à ces questions et de

mieux comprendre le fonctionnement de ce récepteur dont les mécanismes d'activation diffèrent des autres membres de la famille des RCPG.

Shéma 1 : Voies signalétiques de PAR-2 à la membrane plasmique et à la membrane nucléaire.



## **VI. DIRECTIONS FUTURES**

Il serait intéressant de pousser notre étude plus loin afin de déterminer de façon précise les mécanismes signalétiques utilisés par la population de PAR2 au niveau de la membrane nucléaire. La bêta-arrestine 1 est impliquée dans l'internalisation de nombreux RCPG dont PAR-2. Nous pourrions étudier la possibilité d'une existence d'interaction avec la bêta-arrestine pour ces récepteurs au niveau de la membrane nucléaire. Sachant que le site ST363/366 dans la partie C-terminale de PAR-2 est essentiel pour l'interaction avec la bêta-arrestine 1, il est possible de muter ce site pour voir si cela va affecter l'internalisation du récepteur. D'autres sites dans la partie C-terminale auraient probablement aussi un rôle à jouer dans la translocation du récepteur puisque le domaine C-terminal est essentiel pour l'endocytose de plusieurs RCPG. Nous pourrions effectuer des troncations à plusieurs sites de la partie C-terminale pour identifier la région responsable de la translocation du récepteur. Nous pouvons déterminer si ces récepteurs sont phosphorylés ou ubiquitinés suite à leur stimulation. Il a été démontré par exemple que l'ubiquitination de la partie C-terminale de certains RCPG (comme le CXCR4) est impliquée dans leur endocytose et leur trafic intracellulaire. La partie C-terminale de PAR-2 contient des sites comprenant des résidus lysines et qui sont des sites potentiels pour l'ubiquitination. Il est également possible de déterminer le niveau de modification post-transcriptionnelle du récepteur tel la glycosylation. Un autre aspect intéressant à étudier est l'arrêt du signal induit par PAR2 nucléaire. En effet, il est connu que la stimulation de PAR2 localisé à la membrane plasmique va entraîner la phosphorylation du domaine C-terminale de celui-ci et permettre une interaction avec la bêta-arrestine. La bêta-arrestine va ensuite recruter les composantes de la clathrine pour permettre une internalisation des récepteurs par des vésicules appelés endosome. Dans le cas de PAR2,



son activation va entraîner sa dégradation dans les lysosomes suite à son internalisation. Ces récepteurs ne sont pas recyclés vers la membrane plasmique. La resensibilisation de ces récepteurs se fait donc seulement par la synthèse de nouveaux récepteurs. Notre étude nous montre que PAR-2 est aussi transloqué à la membrane nucléaire suite à sa stimulation. Dans le cas de PAR2 situé à la membrane nucléaire, il serait intéressant de voir si ces récepteurs sont dégradés dans des lysosomes après leur stimulation.

Étant donné que la troisième boucle intracellulaire de certains récepteurs couplés aux protéines G est essentielle pour son endocytose, nous pouvons déterminer le rôle de cette troisième boucle dans l'internalisation de PAR-2. Il est probable que la troisième boucle intracellulaire interagisse avec des molécules permettant une translocation du récepteur jusqu'à la membrane nucléaire. La troisième boucle intracellulaire contient des résidus sérine à la position 812 et 815 qui ont un potentiel élevé pour la phosphorylation. Il serait intéressant de muter ces deux sites afin de déterminer leur importance dans l'internalisation de PAR-2. Finalement, des études permettant d'identifier des interactions protéine-protéine nous serviront pour déterminer les molécules responsables de la translocation du récepteur au noyau.

La continuation de cette étude nous permettra d'identifier les domaines majeurs du récepteur PAR-2 permettant la translocation ce récepteur au noyau. À la fin de ce projet, nous serons également en mesure d'identifier les molécules responsables de l'internalisation de ce récepteur. La compréhension de ces mécanismes ouvrira de nouvelles voies pour la régulation de la transcription des gènes. Nos travaux

contribueront au développement de nouvelles thérapies pour le contrôle des pathologies concernant la néovascularisation comme la rétinopathie diabétique et prématurée.

## **VII. FIGURES**

Figure 1 : Internalisation de PAR2 dans les cellules BOSC.

Les cellules sont transfectées de façon transitoire avec PAR-2 GFP. Suite à la transfection, les cellules sont stimulées avec la trypsine 100 nM pendant 60 minutes et fixées avec la paraformaldéhyde 4 % pendant 20 minutes (n=5). Les noyaux sont marqués avec le PI pour la microscopie confocale. Les photos sont prises à l'aide d'un microscope confocale muni d'une caméra numérique.

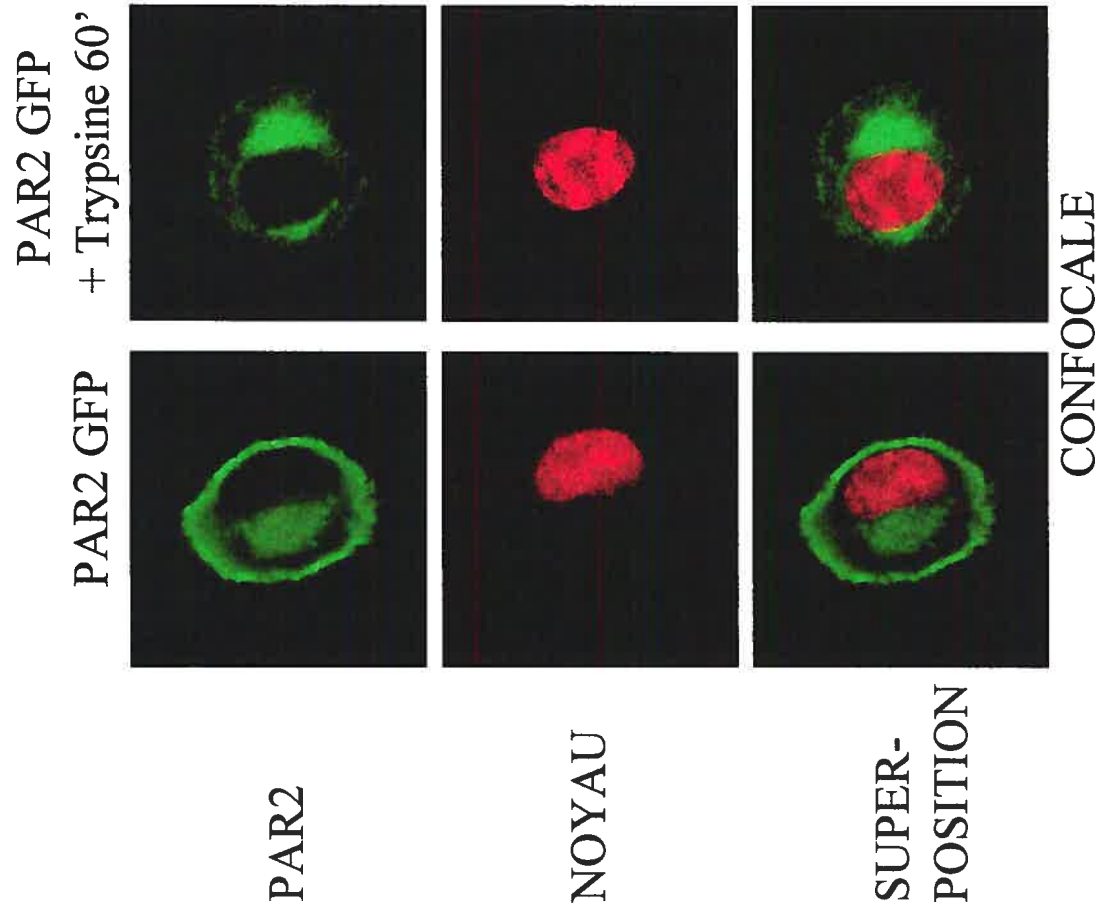


Figure 2 : Translocation de PAR-2 de la membrane plasmique à la membrane nucléaire suite à la stimulation par la trypsine 100 nM dans les cellules BOSC.

Les cellules sont transfectées de façon transitoire avec PAR-2 GFP. Suite à la transfection, les cellules sont stimulées avec la trypsine 100 nM pendant 60 minutes. Les cellules sont ensuite lysées et centrifugées pour séparer les différentes composantes cellulaires. 30 ng de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % afin de séparer les protéines. L'anticorps primaire anti-PAR2 est dilué 250 fois avec du lait 1,5 % dilué dans du tampon TBS-T et incubé pendant 3 heures à la température de la pièce ou 24 heures à 4°C. L'anticorps pour la  $\beta$ -actine est dilué 10000 fois. La réaction avec l'anticorps secondaire se fait avec un anticorps anti-souris IgG conjugués à la peroxidase Horseradish dilué 5000 fois dans du lait 1,5% TBS-T pendant une heure à la température de la pièce (n=3).

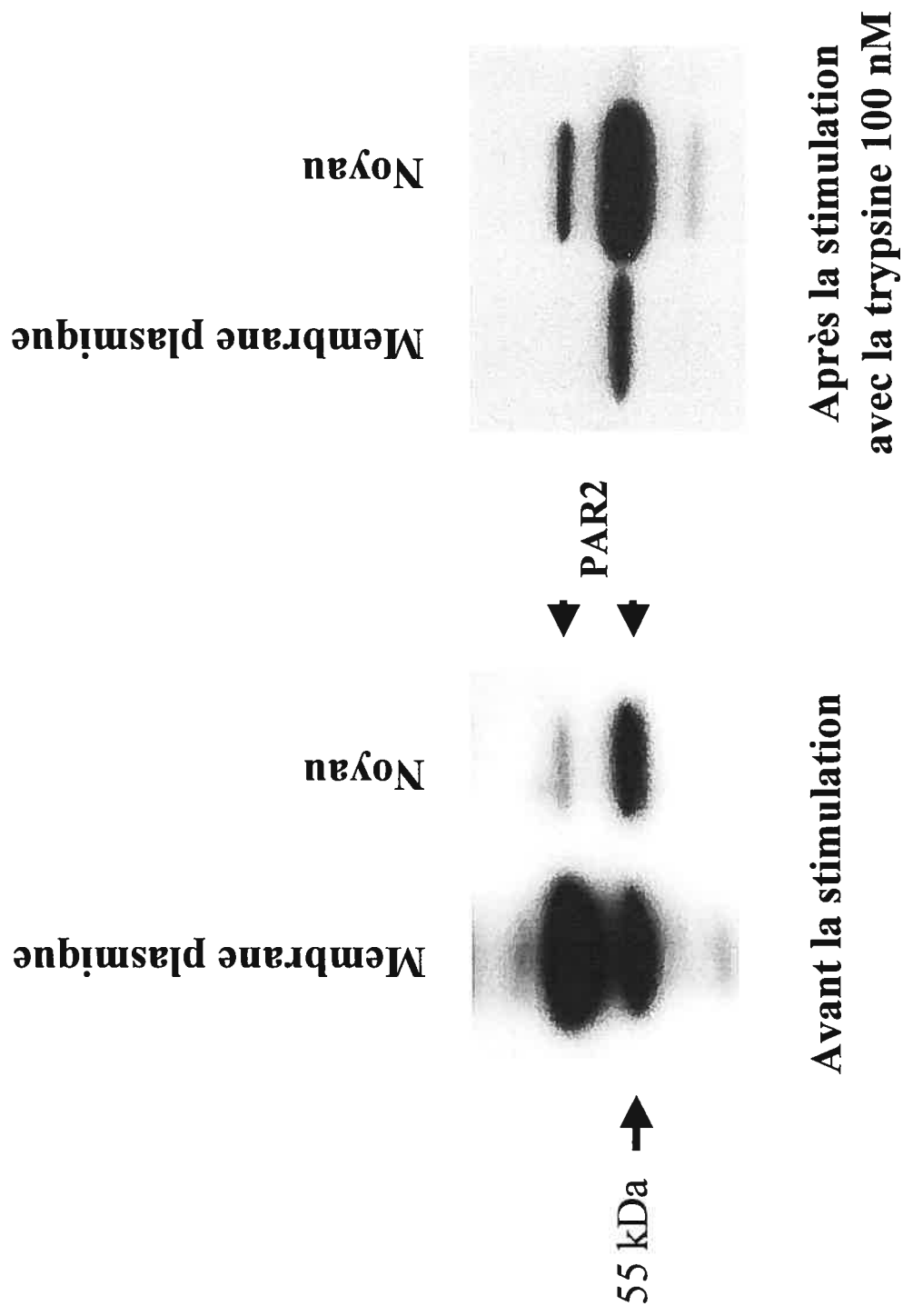


Figure 3 : Pureté des fractions cellulaires.

Les cellules sont transfectées de façon transitoire avec PAR-2 GFP. Suite à la transfection, les cellules sont stimulées avec la trypsine 100 nM pendant 60 minutes. Les cellules sont ensuite lysées et centrifugées pour séparer les différentes composantes cellulaires. 30 ng de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % afin de séparer les protéines. L'anticorps primaire anti-PAR2 est dilué 250 fois avec du lait 1,5 % dilué dans du tampon TBS-T et incubé pendant 3 heures à la température de la pièce ou 24 heures à 4°C. L'anticorps pour les lamines A/C est dilué 30 fois. L'anticorps pour le cytochrome C est dilué 250 fois et celui pour le CD-51 est dilué 250 fois. La réaction avec l'anticorps secondaire se fait avec un anticorps anti-souris IgG conjugués à la peroxidase Horseradish dilué 5000 fois dans du lait 1,5% TBS-T pendant une heure à la température de la pièce (n=3).



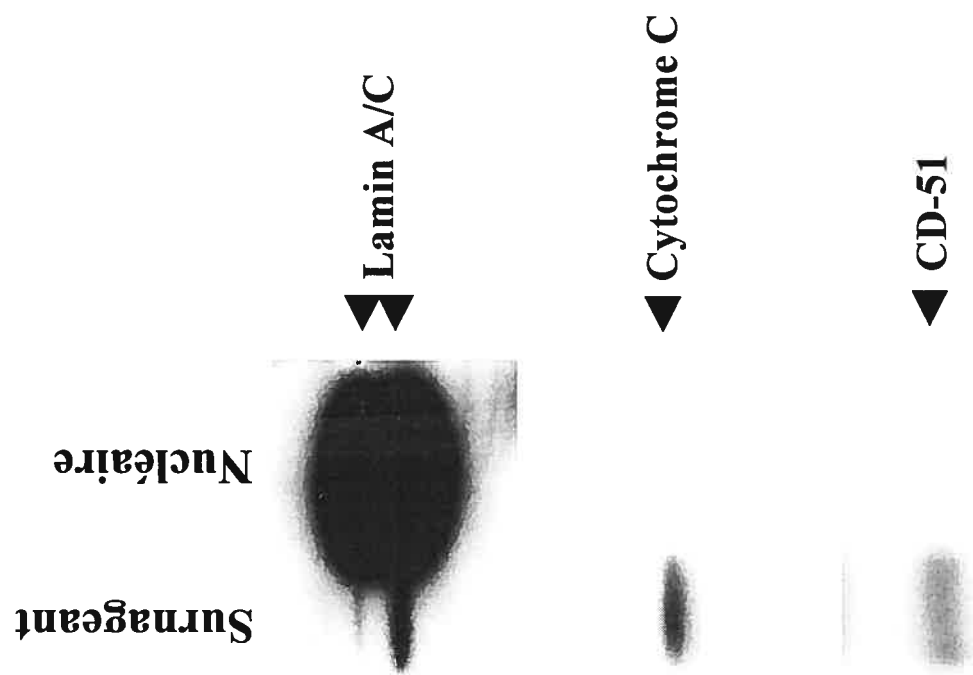


Figure 4 : Activation de PAR2 à la membrane plasmique pendant 1 heure et analyse de l'expression des gènes.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont ensuite stimulées avec le peptide agoniste (AP) de PAR2 pendant 15 minutes à 1 heure dépendamment des gènes analysés. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR. Les données sont analysées à l'aide des tests *t* indépendants et sont présentées sous forme : moyennes  $\pm$  SE de 4-5 expériences. \*  $p < 0.05$  comparé aux valeurs contrôles.

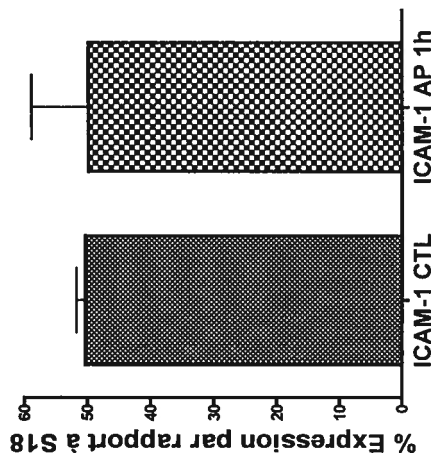
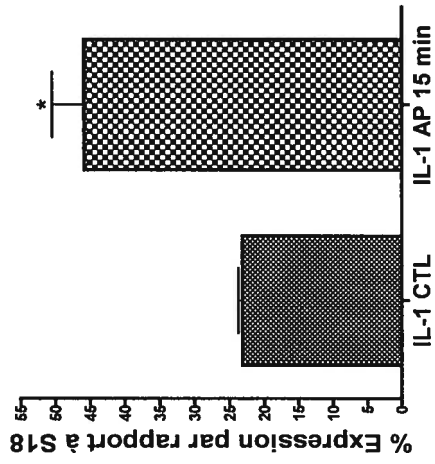
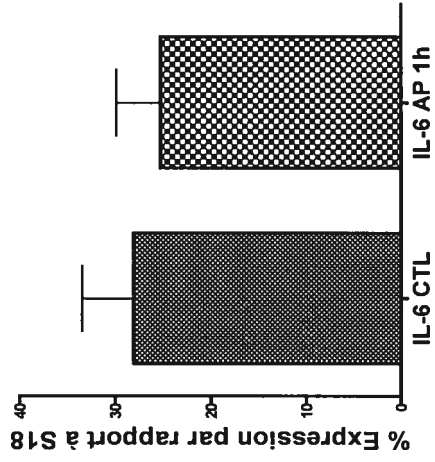
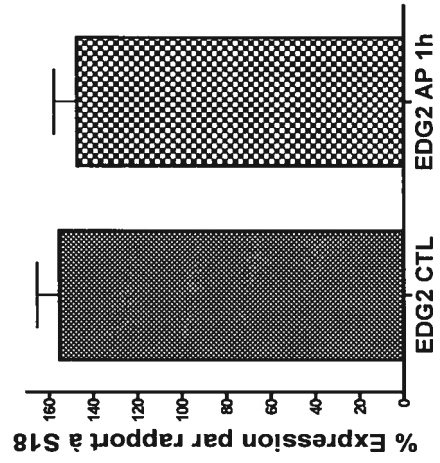
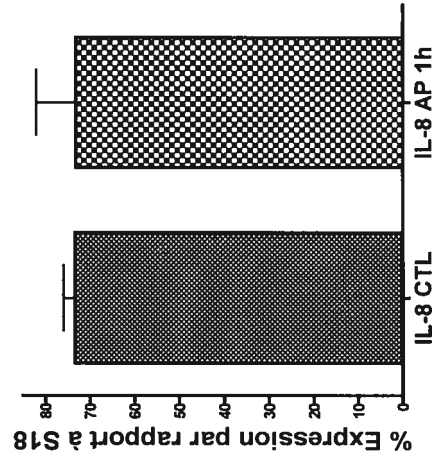


Figure 5 : Activation de PAR2 à la membrane plasmique pendant 3 heure et analyse de l'expression des gènes.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont stimulées avec le peptide agoniste de PAR2 pendant 3 heures. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR. Les données sont analysées à l'aide des tests *t* indépendants et sont présentées sous forme : moyennes  $\pm$  SE de 4-5 expériences. \*  $p < 0.05$  comparé aux valeurs contrôles.

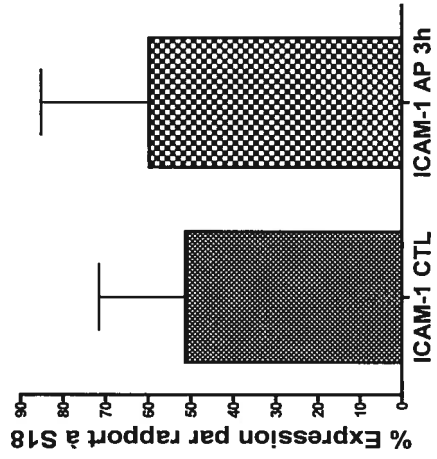
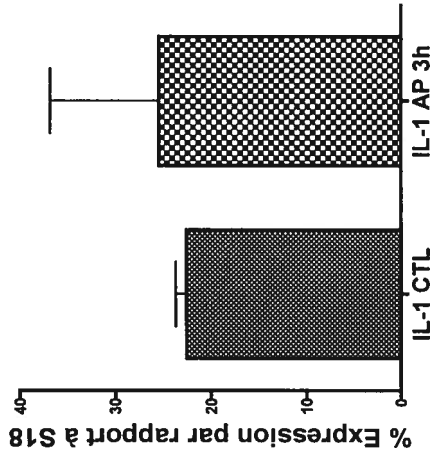
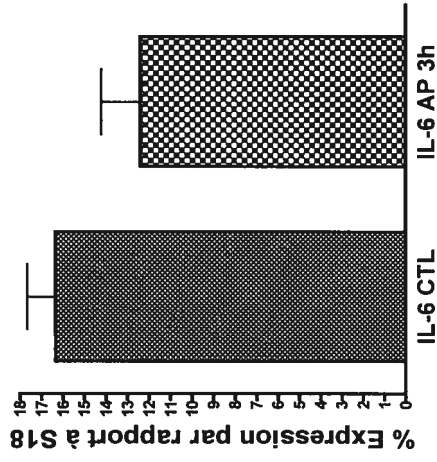
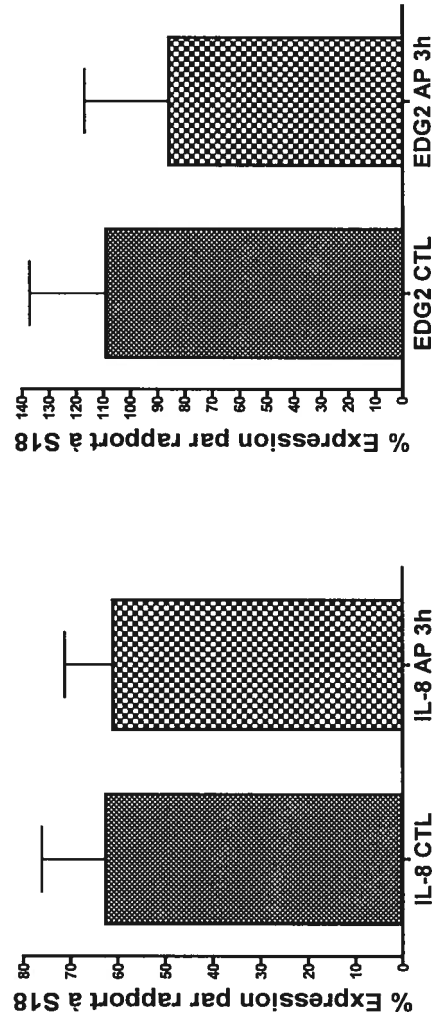


Figure 6 : Activation de PAR2 à la membrane nucléaire pendant 1 heure et analyse de l'expression des gènes.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont broyées grâce à un mortier et un pilon en verre dans un tampon de lyse. Les noyaux sont isolés à l'aide de plusieurs étapes de centrifugation.. Les noyaux sont lavés avec le tampon de lyse contenant 0.1 % NP-40. Les noyaux sont ensuite suspendus dans une solution de réaction et sont stimulés avec le peptide agoniste de PAR2 pendant 15 minutes à 1 heure dépendamment des gènes analysés. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR. Les données sont analysées à l'aide des tests *t* indépendants et sont présentées sous forme : moyennes  $\pm$  SE de 4-5 expériences. \*  $p < 0.05$  comparé aux valeurs contrôles.

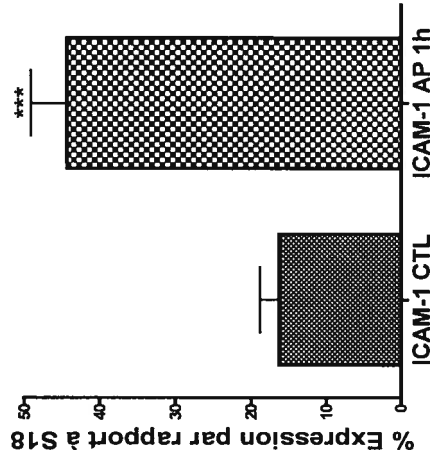
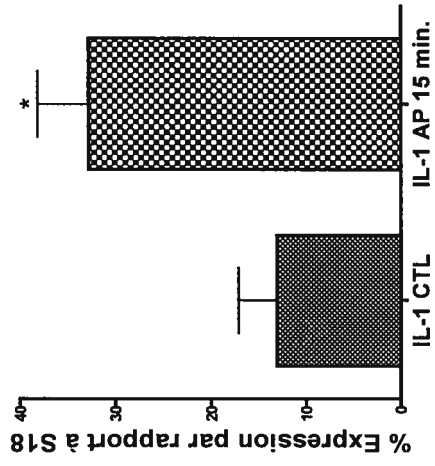
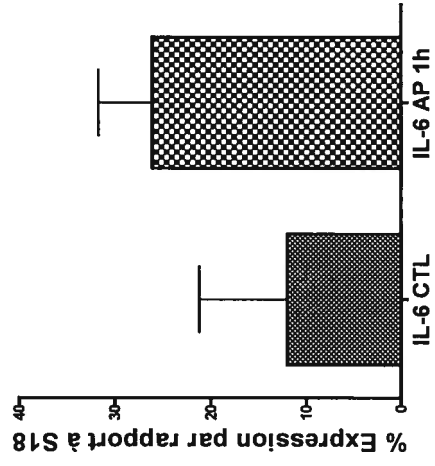
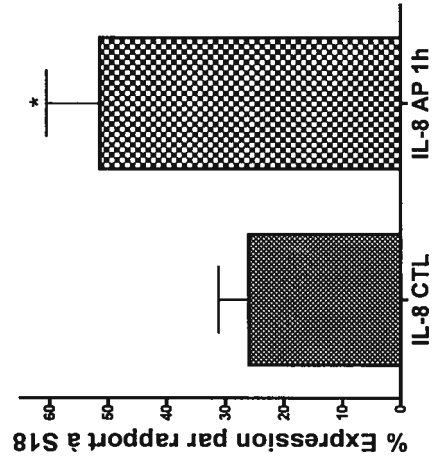
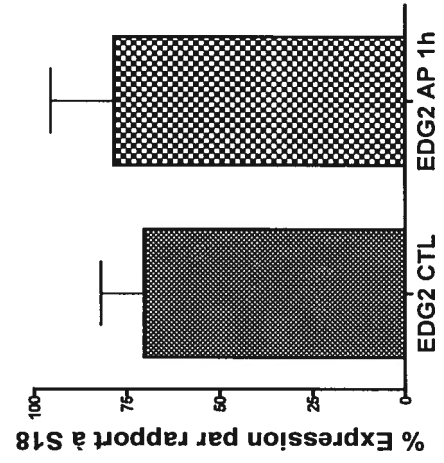


Figure 7 : Activation de PAR2 à la membrane nucléaire pendant 3 heure et analyse de l'expression des gènes.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont broyées grâce à un mortier et un pilon en verre dans un tampon de lyse. Les noyaux sont isolés à l'aide de plusieurs étapes de centrifugation.. Les noyaux sont lavés avec le tampon de lyse contenant 0.1 % NP-40. Les noyaux sont ensuite suspendus dans une solution de réaction et sont stimulés avec le peptide agoniste de PAR2 pendant 3 heures. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR. Les données sont analysées à l'aide des tests *t* indépendants et sont présentées sous forme : moyennes  $\pm$  SE de 4-5 expériences. \*  $p < 0.05$  comparé aux valeurs contrôles.



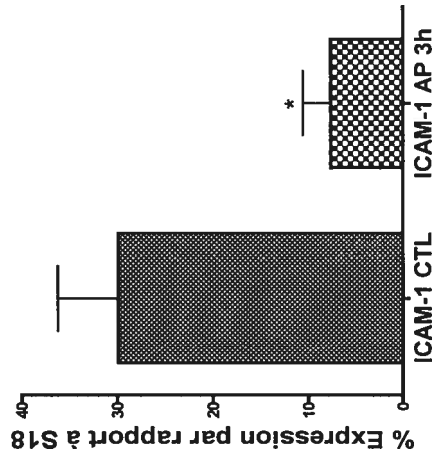
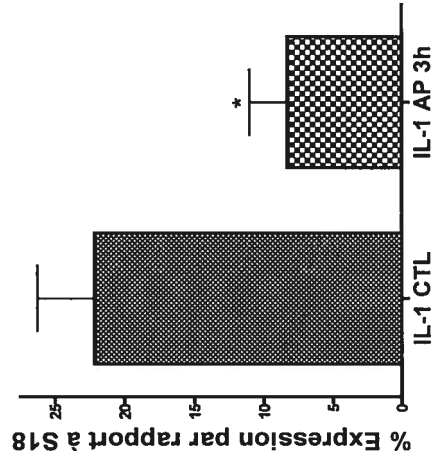
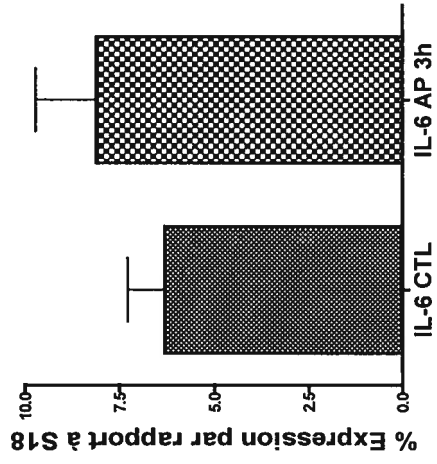
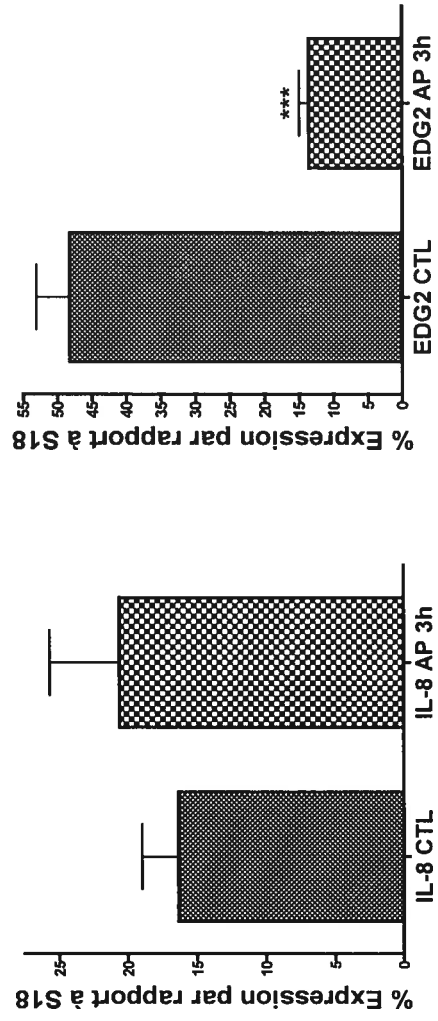


Figure 8: Activation de PAR2 à la membrane plasmique et analyse de l'expression des gènes en fonction du temps.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont stimulées avec le peptide agoniste de PAR2 pendant des temps différents. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR.

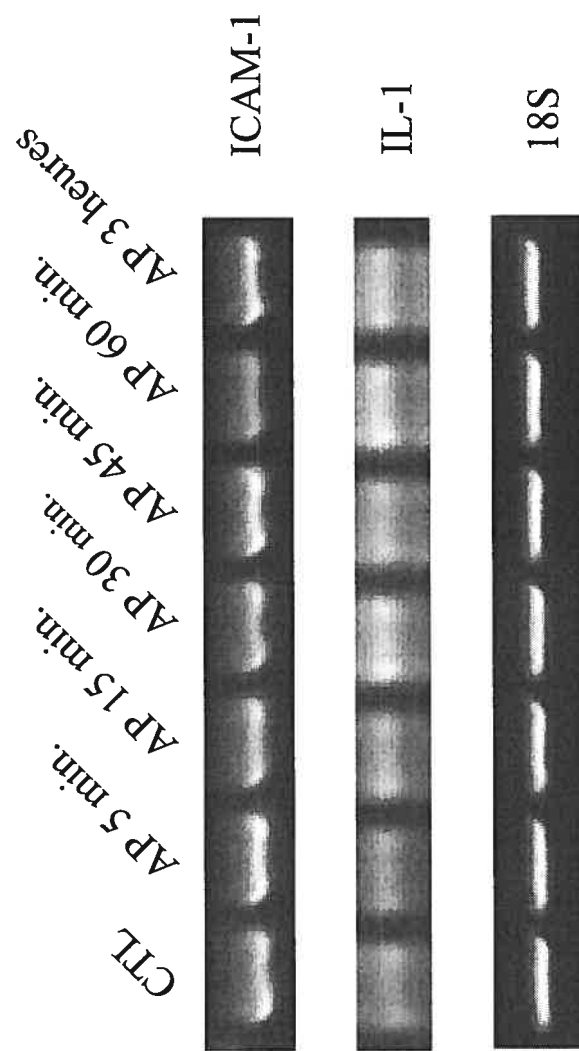


Figure 9 : Activation de PAR2 à la membrane nucléaire et analyse de l'expression des gènes en fonction du temps.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont broyées grâce à un mortier et un pilon en verre dans un tampon de lyse. Les noyaux sont isolés à l'aide de plusieurs étapes de centrifugation.. Les noyaux sont lavés avec le tampon de lyse contenant 0.1 % NP-40. Les noyaux sont ensuite suspendus dans une solution de réaction et sont stimulés avec le peptide agoniste de PAR2 pendant des temps différents. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR.



Figure 10 : Effet des inhibiteurs de ERK1/2, p38 et JNK sur l'expression des gènes suite à l'activation de PAR2 à la membrane plasmique.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont incubées avec les différents inhibiteurs pendant 15 minutes et PAR-2 est ensuite activé à l'aide de son peptide agoniste. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR. Les données sont analysées à l'aide d'un test pour comparaisons multiples (One-way ANOVA) suivi d'un test Bonferroni. Les données sont présentées sous forme : moyennes  $\pm$  SE de 3 expériences. \*  $p < 0.05$  comparé aux valeurs contrôles.

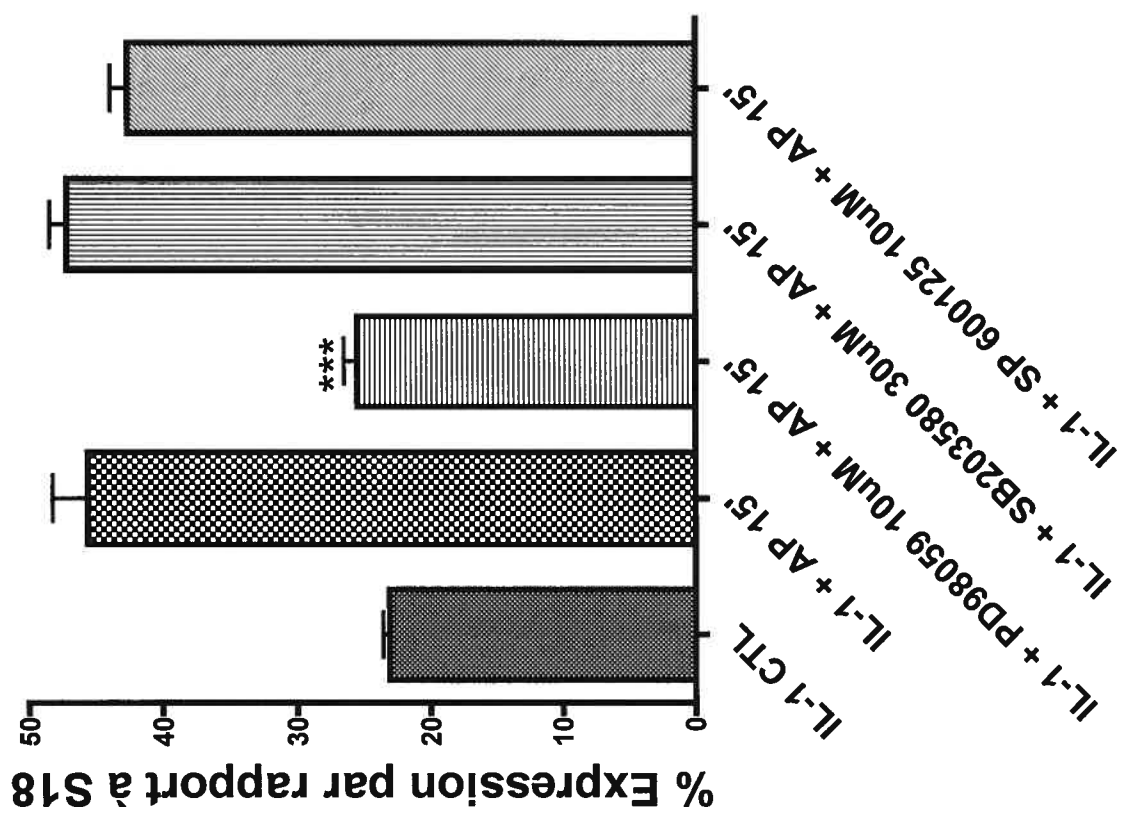
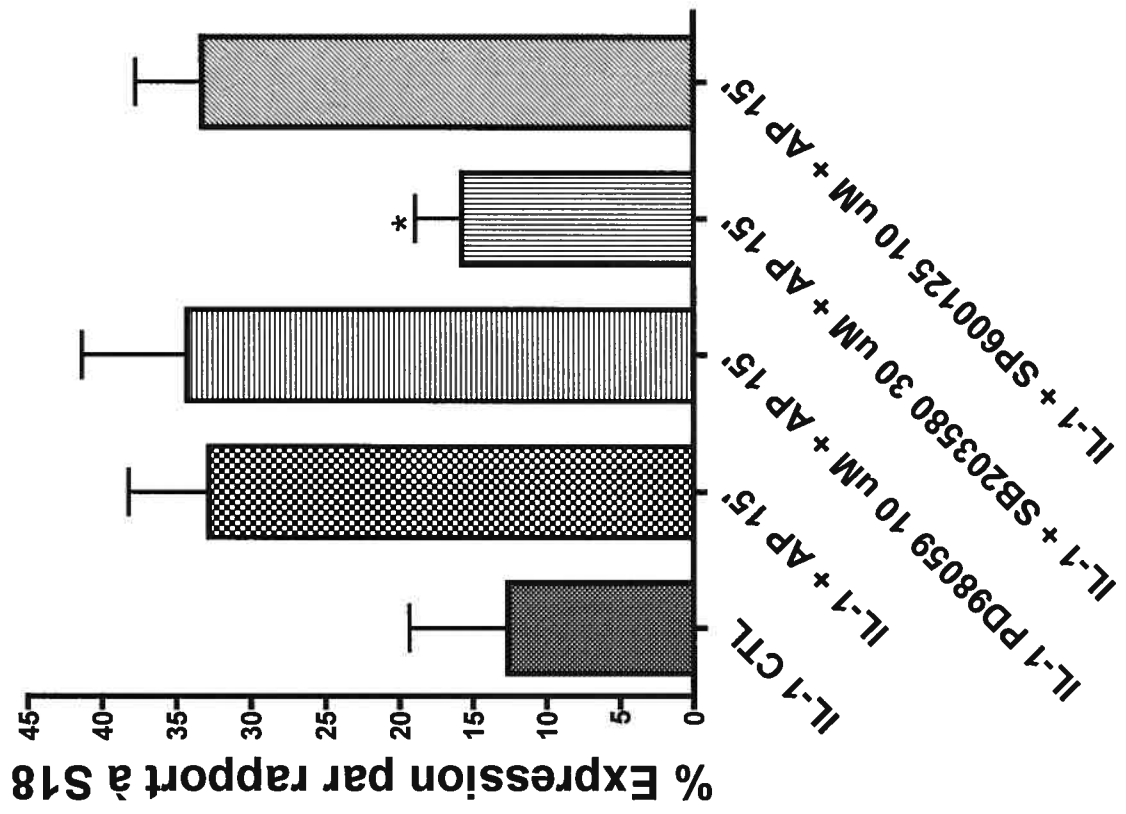


Figure 11 : Effet des inhibiteurs de ERK1/2, p38 et JNK sur l'expression des gènes suite à l'activation de PAR2 à la membrane nucléaire.

Les cellules BOSC sont mises en culture dans des plats de 15 cm jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont broyées grâce à un mortier et un pilon en verre dans un tampon de lyse. Les noyaux sont isolés à l'aide de plusieurs étapes de centrifugation.. Les noyaux sont lavés avec le tampon de lyse contenant 0.1 % NP-40. Les noyaux sont ensuite suspendus dans une solution de réaction. Ils sont incubés avec les différents inhibiteurs pendant différents temps et PAR-2 est ensuite activé à l'aide de son peptide agoniste. La réaction est arrêtée à l'aide de la solution de TRIZOL. L'ARN est isolé pour procéder au RT-PCR. Les données sont analysées à l'aide d'un test pour comparaisons multiples (One-way ANOVA) suivi d'un test Bonferroni. Les données sont présentées sous forme : moyennes  $\pm$  SE de 3 expériences. \*  $p < 0.05$  comparé aux valeurs contrôles.





## VIII. BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, D.H. & SHAW, S. (1994) Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*. **343**: 831-836.
- AL-ANI, B., SAIFEDDINE, M. & HOLLENBERG, M.D. (1995) Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. **73**: 1203-1207.
- AL-ANI, B., SAIFEDDINE, M., KAWABATA, A. & HOLLENBERG, M.D. (1999) Proteinase activated receptor 2: Role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation. *Br J Pharmacol*. **128**: 1105-1113.
- ALLEN, G.A., MONROE, D.M., 3RD, ROBERTS, H.R. & HOFFMAN, M. (2000) The effect of factor X level on thrombin generation and the procoagulant effect of activated factor VII in a cell-based model of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. **11 Suppl 1**: S3-7.
- ALM, A.K., GAGNEMO-PERSSON, R., SORSA, T. & SUNDELIN, J. (2000) Extraprostatic trypsin-2 cleaves proteinase-activated receptor-2. *Biochem Biophys Res Commun*. **275**: 77-83.

- ASOKANANTHAN, N., GRAHAM, P.T., FINK, J., KNIGHT, D.A., BAKKER, A.J., MCWILLIAM, A.S., THOMPSON, P.J. & STEWART, G.A. (2002) Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol.* **168**: 3577-3585.
- BAGGIOLINI, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* **392**: 565-568.
- BAHOU, W.F., KUTOK, J.L., WONG, A., POTTER, C.L. & COLLIER, B.S. (1994) Identification of a novel thrombin receptor sequence required for activation-dependent responses. *Blood.* **84**: 4195-4202.
- BARATH, P., FISHBEIN, M.C., CAO, J., BERENSON, J., HELFANT, R.H. & FORRESTER, J.S. (1990) Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol.* **65**: 297-302.
- BARSONY, J. & MARX, S.J. (1990) Immunocytochemistry on microwave-fixed cells reveals rapid and agonist-specific changes in subcellular accumulation patterns for cAMP or cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 1188-1192.
- BERGER, P., TUNON-DE-LARA, J.M., SAVINEAU, J.P. & MARTHAN, R. (2001) Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol.* **91**: 995-1003.

- BHATTACHARYA, M., PERI, K.G., ALMAZAN, G., RIBEIRO-DA-SILVA, A., SHICHI, H., DUROCHER, Y., ABRAMOVITZ, M., HOU, X., VARMA, D.R. & CHEMTOB, S. (1998) Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 15792-15797.
- BIEDERMANN, T., KNEILLING, M., MAILHAMMER, R., MAIER, K., SANDER, C.A., KOLLIAS, G., KUNKEL, S.L., HULTNER, L. & ROCKEN, M. (2000) Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med*. **192**: 1441-1452.
- BOHM, S.K., KHITIN, L.M., GRADY, E.F., APONTE, G., PAYAN, D.G. & BUNNETT, N.W. (1996a) Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem*. **271**: 22003-22016.
- BOHM, S.K., KONG, W., BROMME, D., SMEEKENS, S.P., ANDERSON, D.C., CONNOLLY, A., KAHN, M., NELKEN, N.A., COUGHLIN, S.R., PAYAN, D.G. & BUNNETT, N.W. (1996b) Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J*. **314 ( Pt 3)**: 1009-1016.

- BONNER, T.I., YOUNG, A.C., BRANN, M.R. & BUCKLEY, N.J. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*. **1**: 403-410.
- BOS, J.L. (1998) All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J*. **17**: 6776-6782.
- BRETSCHNEIDER, E., KAUFMANN, R., BRAUN, M., WITTPOTH, M., GLUSA, E., NOWAK, G. & SCHROR, K. (1999) Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. **126**: 1735-1740.
- BROWN, J.K., JONES, C.A., TYLER, C.L., RUOSS, S.J., HARTMANN, T. & CAUGHEY, G.H. (1995a) Tryptase-induced mitogenesis in airway smooth muscle cells. Potency, mechanisms, and interactions with other mast cell mediators. *Chest*. **107**: 95S-96S.
- BROWN, J.K., TYLER, C.L., JONES, C.A., RUOSS, S.J., HARTMANN, T. & CAUGHEY, G.H. (1995b) Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **13**: 227-236.

BRYANT, D.M., WYLIE, F.G. & STOW, J.L. (2005) Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin.

*Mol Biol Cell.* **16**: 14-23.

BUCHNER, K. (1995) Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur J Biochem.* **228**: 211-221.

CAMERER, E., KOLSTO, A.B. & PRYDZ, H. (1996) Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* **81**: 1-41.

CHASE, P.B., HALONEN, M. & REGAN, J.W. (1993) Cloning of a human platelet-activating factor receptor gene: evidence for an intron in the 5'-untranslated region. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **8**: 240-244.

CHENG, M., BOULTON, T.G. & COBB, M.H. (1996) ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem.* **271**: 8951-8958.

CITORES, L., KHNYKIN, D., SORENSEN, V., WESCHE, J., KLINGENBERG, O., WIEDLOCHA, A. & OLSNES, S. (2001) Modulation of intracellular transport of acidic fibroblast growth factor by mutations in the cytoplasmic receptor domain. *J Cell Sci.* **114**: 1677-1689.

- CITORES, L., WESCHE, J., KOLPAKOVA, E. & OLSNES, S. (1999) Uptake and intracellular transport of acidic fibroblast growth factor: evidence for free and cytoskeleton-anchored fibroblast growth factor receptors. *Mol Biol Cell*. **10**: 3835-3848.
- CLAING, A., CHEN, W., MILLER, W.E., VITALE, N., MOSS, J., PREMONT, R.T. & LEFKOWITZ, R.J. (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem*. **276**: 42509-42513.
- CLARK, R.B. (1986) Desensitization of hormonal stimuli coupled to regulation of cyclic AMP levels. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*. **20**: 151-209.
- COCKS, T.M., FONG, B., CHOW, J.M., ANDERSON, G.P., FRAUMAN, A.G., GOLDIE, R.G., HENRY, P.J., CARR, M.J., HAMILTON, J.R. & MOFFATT, J.D. (1999) A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature*. **398**: 156-160.
- COMPTON, S.J., RENAUX, B., WIJESURIYA, S.J. & HOLLENBERG, M.D. (2001) Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br J Pharmacol*. **134**: 705-718.



- DAMIANO, B.P., CHEUNG, W.M., MITCHELL, J.A. & FALOTICO, R. (1996)  
Cardiovascular actions of thrombin receptor activation in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* **279**: 1365-1378.
- D'ANDREA, M.R., DERIAN, C.K., LETURCQ, D., BAKER, S.M., BRUNMARK, A.,  
LING, P., DARROW, A.L., SANTULLI, R.J., BRASS, L.F. & ANDRADE-  
GORDON, P. (1998) Characterization of protease-activated receptor-2  
immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* **46**: 157-164.
- DARMOUL, D., GRATIO, V., DEVAUD, H. & LABURTHE, M. (2004) Protease-  
activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and  
cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor  
transactivation. *J Biol Chem.* **279**: 20927-20934.
- DAVIE, E.W. & RATNOFF, O.D. (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood  
Clotting. *Science.* **145**: 1310-1312.
- DEFEA, K.A., ZALEVSKY, J., THOMA, M.S., DERY, O., MULLINS, R.D. &  
BUNNETT, N.W. (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-  
activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J  
Cell Biol.* **148**: 1267-1281.

- DRAB, M., VERKADE, P., ELGER, M., KASPER, M., LOHN, M., LAUTERBACH, B., MENNE, J., LINDSCHAU, C., MENDE, F., LUFT, F.C., SCHEDL, A., HALLER, H. & KURZCHALIA, T.V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. **293**: 2449-2452.
- D'SANTOS, C.S., CLARKE, J.H. & DIVECHA, N. (1998) Phospholipid signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide signalering in de nucleus. *Biochim Biophys Acta*. **1436**: 201-232.
- ENGELMAN, J.A., WYKOFF, C.C., YASUHARA, S., SONG, K.S., OKAMOTO, T. & LISANTI, M.P. (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem*. **272**: 16374-16381.
- FIORUCCI, S., MENCARELLI, A., PALAZZETTI, B., DISTRUTTI, E., VERGNOLLE, N., HOLLENBERG, M.D., WALLACE, J.L., MORELLI, A. & CIRINO, G. (2001) Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 13936-13941.

FRA, A.M., WILLIAMSON, E., SIMONS, K. & PARTON, R.G. (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 8655-8659.

GOBEIL, F., JR., BERNIER, S.G., VAZQUEZ-TELLO, A., BRAULT, S., BEAUCHAMP, M.H., QUINIOU, C., MARRACHE, A.M., CHECCHIN, D., SENNLAUB, F., HOU, X., NADER, M., BKAILY, G., RIBEIRO-DA-SILVA, A., GOETZL, E.J. & CHEMTOB, S. (2003) Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem*. **278**: 38875-38883.

GOBEIL, F., JR., DUMONT, I., MARRACHE, A.M., VAZQUEZ-TELLO, A., BERNIER, S.G., ABRAN, D., HOU, X., BEAUCHAMP, M.H., QUINIOU, C., BOUAYAD, A., CHOUFANI, S., BHATTACHARYA, M., MOLOTCHNIKOFF, S., RIBEIRO-DA-SILVA, A., VARMA, D.R., BKAILY, G. & CHEMTOB, S. (2002) Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ Res*. **90**: 682-689.

GRIENDLING, K.K., BERK, B.C., GANZ, P., GIMBRONE, M.A., JR. & ALEXANDER, R.W. (1987) Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle phosphoinositide metabolism. State of the art lecture. *Hypertension*. **9**: III181-185.

HAMILTON, J.R., NGUYEN, P.B. & COCKS, T.M. (1998) Atypical protease-activated receptor mediates endothelium-dependent relaxation of human coronary arteries. *Circ Res.* **82**: 1306-1311.

HEINRICH, P.C., CASTELL, J.V. & ANDUS, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* **265**: 621-636.

HENDERSON, J.E., AMIZUKA, N., WARSHAWSKY, H., BIASOTTO, D., LANSKE, B.M., GOLTZMAN, D. & KARAPLIS, A.C. (1995) Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol.* **15**: 4064-4075.

HIROTA, Y., OSUGA, Y., HIRATA, T., KOGA, K., YOSHINO, O., HARADA, M., MORIMOTO, C., NOSE, E., YANO, T., TSUTSUMI, O. & TAKETANI, Y. (2005) Evidence for the presence of protease-activated receptor 2 and its possible implication in remodeling of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* **90**: 1662-1669.

HOFFMAN, M. (2003) Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis.* **16**: 17-20.

HOLLENBERG, M.D. (2003) Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci.* **74**: 237-246.

- HUNG, D.T., WONG, Y.H., VU, T.K. & COUGHLIN, S.R. (1992) The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* **267**: 20831-20834.
- HUNOT, S., BRUGG, B., RICARD, D., MICHEL, P.P., MURIEL, M.P., RUBERG, M., FAUCHEUX, B.A., AGID, Y. & HIRSCH, E.C. (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 7531-7536.
- HUNYADY, L., MERELLI, F., BAUKAL, A.J., BALLA, T. & CATT, K.J. (1991) Agonist-induced endocytosis and signal generation in adrenal glomerulosa cells. A potential mechanism for receptor-operated calcium entry. *J Biol Chem.* **266**: 2783-2788.
- HWA, J.J., GHIBAUDI, L., WILLIAMS, P., CHINTALA, M., ZHANG, R., CHATTERJEE, M. & SYBERTZ, E. (1996) Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res.* **78**: 581-588.
- ISHII, K., CHEN, J., ISHII, M., KOCH, W.J., FREEDMAN, N.J., LEFKOWITZ, R.J. & COUGHLIN, S.R. (1994) Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-

protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem.* **269**: 1125-1130.

JAKEL, S. & GORLICH, D. (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J.* **17**: 4491-4502.

KAHN, M.L., HAMMES, S.R., BOTKA, C. & COUGHLIN, S.R. (1998) Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem.* **273**: 23290-23296.

KANKE, T., MACFARLANE, S.R., SEATTER, M.J., DAVENPORT, E., PAUL, A., MCKENZIE, R.C. & PLEVIN, R. (2001) Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem.* **276**: 31657-31666.

KAWABATA, A., KINOSHITA, M., NISHIKAWA, H., KURODA, R., NISHIDA, M., ARAKI, H., ARIZONO, N., ODA, Y. & KAKEHI, K. (2001) The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest.* **107**: 1443-1450.

- KAWABATA, A., KURODA, R., MINAMI, T., KATAOKA, K. & TANEDA, M.  
(1998) Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br J Pharmacol.* **125**: 419-422.
- KAWAGOE, J., TAKIZAWA, T., MATSUMOTO, J., TAMIYA, M., MEEK, S.E.,  
SMITH, A.J., HUNTER, G.D., PLEVIN, R., SAITO, N., KANKE, T., FUJII, M.  
& WADA, Y. (2002) Effect of protease-activated receptor-2 deficiency on  
allergic dermatitis in the mouse ear. *Jpn J Pharmacol.* **88**: 77-84.
- KAZIRO, Y., ITOH, H., KOZASA, T., NAKAFUKU, M. & SATOH, T. (1991)  
Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev  
Biochem.* **60**: 349-400.
- KIM, S.J. & KAHN, C.R. (1997) Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase  
kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell  
nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem J.* **323** ( Pt  
3): 621-627.
- KJALKE, M., MONROE, D.M., HOFFMAN, M., OLIVER, J.A., EZBAN, M.,  
HEDNER, U. & ROBERTS, H.R. (1998) The effects of activated factor VII in a  
cell-based model for tissue factor-initiated coagulation. *Blood Coagul  
Fibrinolysis.* **9 Suppl 1**: S21-25.

- KOIVUNEN, E., RISTIMAKI, A., ITKONEN, O., OSMAN, S., VUENTO, M. & STENMAN, U.H. (1991) Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. *Cancer Res.* **51**: 2107-2112.
- KOLESKE, A.J., BALTIMORE, D. & LISANTI, M.P. (1995) Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 1381-1385.
- KOSHIKAWA, N., HASEGAWA, S., NAGASHIMA, Y., MITSUHASHI, K., TSUBOTA, Y., MIYATA, S., MIYAGI, Y., YASUMITSU, H. & MIYAZAKI, K. (1998) Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am J Pathol.* **153**: 937-944.
- KOSHIKAWA, N., NAGASHIMA, Y., MIYAGI, Y., MIZUSHIMA, H., YANOMA, S., YASUMITSU, H. & MIYAZAKI, K. (1997) Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* **409**: 442-448.
- KOSHIKAWA, N., YASUMITSU, H., NAGASHIMA, Y., UMEDA, M. & MIYAZAKI, K. (1994) Identification of one- and two-chain forms of trypsinogen 1 produced by a human gastric adenocarcinoma cell line. *Biochem J.* **303** ( Pt 1): 187-190.
- KRISHNA, M.T., CHAUHAN, A., LITTLE, L., SAMPSON, K., HAWKSWORTH, R., MANT, T., DJUKANOVIC, R., LEE, T. & HOLGATE, S. (2001) Inhibition of



mast cell tryptase by inhaled APC 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **107**: 1039-1045.

LE, P.U., GUAY, G., ALTSCHULER, Y. & NABI, I.R. (2002) Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **277**: 3371-3379.

LEFKOWITZ, R.J. (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell.* **74**: 409-412.

LEFKOWITZ, R.J. & CARON, M.G. (1988) Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem.* **263**: 4993-4996.

LESLIE, D.M., ZHANG, W., TIMNEY, B.L., CHAIT, B.T., ROUT, M.P., WOZNIAK, R.W. & AITCHISON, J.D. (2004) Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of Kap121p-mediated nuclear import. *Mol Cell Biol.* **24**: 8487-8503.

LEVITZKI, A. (1988) From epinephrine to cyclic AMP. *Science.* **241**: 800-806.

LIN, S.Y., MAKINO, K., XIA, W., MATIN, A., WEN, Y., KWONG, K.Y.,  
BOURGUIGNON, L. & HUNG, M.C. (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* **3**: 802-808.

LOBIE, P.E., WOOD, T.J., CHEN, C.M., WATERS, M.J. & NORSTEDT, G. (1994)

Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J Biol Chem.* **269**: 31735-31746.

LONGIN, A.S., MEZIN, P., FAVIER, A. & VERDETTI, J. (1997) Presence of zinc and calcium permeant channels in the inner membrane of the nuclear envelope.

*Biochem Biophys Res Commun.* **235**: 236-241.

LU, D., YANG, H., SHAW, G. & RAIZADA, M.K. (1998) Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons.

*Endocrinology.* **139**: 365-375.

LUTTRELL, L.M., DAAKA, Y., DELLA ROCCA, G.J. & LEFKOWITZ, R.J. (1997) G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J Biol Chem.* **272**: 31648-31656.

MAGAZINE, H.I., KING, J.M. & SRIVASTAVA, K.D. (1996) Protease activated receptors modulate aortic vascular tone. *Int J Cardiol.* **53 Suppl**: S75-80.

MAHER, P.A. (1996) Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2. *J Cell Biol.* **134**: 529-536.

MAJERUS, P.W. (1992) Inositol phosphate biochemistry. *Annu Rev Biochem.* **61**: 225-250.

MALVIYA, A.N. & ROGUE, P.J. (1998) "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell.* **92**: 17-23.

MARCHESE, A. & BENOVIC, J.L. (2001) Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem.* **276**: 45509-45512.

MARRACHE, A.M., GOBEIL, F., JR., BERNIER, S.G., STANKOVA, J., ROLAPLESZCZYNSKI, M., CHOUFANI, S., BKAILY, G., BOURDEAU, A., SIROIS, M.G., VAZQUEZ-TELLO, A., FAN, L., JOYAL, J.S., FILEP, J.G., VARMA, D.R., RIBEIRO-DA-SILVA, A. & CHEMTOB, S. (2002) Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol.* **169**: 6474-6481.

MARRACHE, A.M., GOBEIL, F., ZHU, T. & CHEMTOB, S. (2005) Intracellular signaling of lipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors. *Endothelium.* **12**: 63-72.

- MERTANI, H.C., RACCURT, M., ABBATE, A., KINDBLOM, J., TORNELL, J., BILLESTRUP, N., USSON, Y., MOREL, G. & LOBIE, P.E. (2003) Nuclear translocation and retention of growth hormone. *Endocrinology*. **144**: 3182-3195.
- MILIA, A.F., SALIS, M.B., STACCA, T., PINNA, A., MADEDDU, P., TREVISANI, M., GEPPETTI, P. & EMANUELI, C. (2002) Protease-activated receptor-2 stimulates angiogenesis and accelerates hemodynamic recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ Res*. **91**: 346-352.
- MIRRE, C., MONLAUZEUR, L., GARCIA, M., DELGROSSI, M.H. & LE BIVIC, A. (1996) Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin. *Am J Physiol*. **271**: C887-894.
- MITCHELL, R., MCCULLOCH, D., LUTZ, E., JOHNSON, M., MACKENZIE, C., FENNELL, M., FINK, G., ZHOU, W. & SEALFON, S.C. (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature*. **392**: 411-414.
- MOFFATT, J.D. & COCKS, T.M. (1998) Endothelium-dependent and -independent responses to protease-activated receptor-2 (PAR-2) activation in mouse isolated renal arteries. *Br J Pharmacol*. **125**: 591-594.

- NANEVICZ, T., WANG, L., CHEN, M., ISHII, M. & COUGHLIN, S.R. (1996)  
Thrombin receptor activating mutations. Alteration of an extracellular agonist  
recognition domain causes constitutive signaling. *J Biol Chem.* **271**: 702-706.
- NAPOLI, C., CICALA, C., WALLACE, J.L., DE NIGRIS, F., SANTAGADA, V.,  
CALIENDO, G., FRANCONI, F., IGNARRO, L.J. & CIRINO, G. (2000)  
Protease-activated receptor-2 modulates myocardial ischemia-reperfusion injury  
in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 3678-3683.
- NEER, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.*  
**80**: 249-257.
- NG, S.B., TAN, Y.H. & GUY, G.R. (1994) Differential induction of the interleukin-6  
gene by tumor necrosis factor and interleukin-1. *J Biol Chem.* **269**: 19021-19027.
- NISHIYAMA, K., TRAPP, B.D., IKEZU, T., RANSOHOFF, R.M., TOMITA, T.,  
IWATSUBO, T., KANAZAWA, I., HSIAO, K.K., LISANTI, M.P. &  
OKAMOTO, T. (1999) Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated  
cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **19**:  
6538-6548.

NYSTEDT, S., LARSSON, A.K., ABERG, H. & SUNDELIN, J. (1995) The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem.* **270**: 5950-5955.

NYSTEDT, S., RAMAKRISHNAN, V. & SUNDELIN, J. (1996) The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem.* **271**: 14910-14915.

OBERST, M., ANDERS, J., XIE, B., SINGH, B., OSSANDON, M., JOHNSON, M., DICKSON, R.B. & LIN, C.Y. (2001) Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* **158**: 1301-1311.

OFFERMANN, S., LAUGWITZ, K.L., SPICHER, K. & SCHULTZ, G. (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 504-508.

OKAMOTO, T., NISHIBORI, M., SAWADA, K., IWAGAKI, H., NAKAYA, N., JIKUHARA, A., TANAKA, N. & SAEKI, K. (2001) The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. *J Neural Transm.* **108**: 125-140.

- OKAMOTO, T., SCHLEGEL, A., SCHERER, P.E. & LISANTI, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* **273**: 5419-5422.
- ORLANDI, P.A. & FISHMAN, P.H. (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* **141**: 905-915.
- PALADE, G.E. (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem.* **1**: 188-211.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B.E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* **22**: 153-183.
- PEMBERTON, L.F. & PASCHAL, B.M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.* **6**: 187-198.
- POLLARD, V.W., MICHAEL, W.M., NAKIELNY, S., SIOMI, M.C., WANG, F. & DREYFUSS, G. (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell.* **86**: 985-994.

PRESLEY, J.F., MAYOR, S., MCGRAW, T.E., DUNN, K.W. & MAXFIELD, F.R.

(1997) Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J Biol Chem.* **272**: 13929-13936.

RAZANI, B., ENGELMAN, J.A., WANG, X.B., SCHUBERT, W., ZHANG, X.L.,

MARKS, C.B., MACALUSO, F., RUSSELL, R.G., LI, M., PESTELL, R.G., DI

VIZIO, D., HOU, H., JR., KNEITZ, B., LAGAUD, G., CHRIST, G.J.,

EDELMANN, W. & LISANTI, M.P. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem.*

**276**: 38121-38138.

RE, R. (1999) The nature of intracrine peptide hormone action. *Hypertension.* **34**: 534-538.

RE, R. & PARAB, M. (1984) Effect of angiotensin II on RNA synthesis by isolated nuclei. *Life Sci.* **34**: 647-651.

REILLY, J.F., MIZUKOSHI, E. & MAHER, P.A. (2004) Ligand dependent and independent internalization and nuclear translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1. *DNA Cell Biol.* **23**: 538-548.

ROSENFELD, J.L., KNOLL, B.J. & MOORE, R.H. (2002) Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases. *Receptors Channels.* **8**: 87-97.



- ROY, S.S., SAIFEDDINE, M., LOUTZENHISER, R., TRIGGLE, C.R. & HOLLENBERG, M.D. (1998) Dual endothelium-dependent vascular activities of proteinase-activated receptor-2-activating peptides: evidence for receptor heterogeneity. *Br J Pharmacol.* **123**: 1434-1440.
- SAIFEDDINE, M., AL-ANI, B., CHENG, C.H., WANG, L. & HOLLENBERG, M.D. (1996) Rat proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): cDNA sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue. *Br J Pharmacol.* **118**: 521-530.
- SANCEAU, J., KAISHO, T., HIRANO, T. & WIETZERBIN, J. (1995) Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *J Biol Chem.* **270**: 27920-27931.
- SARRET, P., NOUEL, D., DAL FARRA, C., VINCENT, J.P., BEAUDET, A. & MAZELLA, J. (1999) Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem.* **274**: 19294-19300.
- SCHERER, P.E. & LISANTI, M.P. (1997) Association of phosphofructokinase-M with caveolin-3 in differentiated skeletal myotubes. Dynamic regulation by

extracellular glucose and intracellular metabolites. *J Biol Chem.* **272**: 20698-20705.

SCHWAB, W., GALBIATI, F., VOLONTE, D., HEMPEL, U., WENZEL, K.W., FUNK, R.H., LISANTI, M.P. & KASPER, M. (1999) Characterisation of caveolins from cartilage: expression of caveolin-1, -2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia. *Histochem Cell Biol.* **112**: 41-49.

SCOTT, C.F., SILVER, L.D., PURDON, A.D. & COLMAN, R.W. (1985) Cleavage of human high molecular weight kininogen by factor XIa in vitro. Effect on structure and function. *J Biol Chem.* **260**: 10856-10863.

SEACHRIST, J.L. & FERGUSON, S.S. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci.* **74**: 225-235.

SENGER, B., SIMOS, G., BISCHOFF, F.R., PODTELEJNIKOV, A., MANN, M. & HURT, E. (1998) Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *Embo J.* **17**: 2196-2207.

SHENOY, S.K., MCDONALD, P.H., KOHOUT, T.A. & LEFKOWITZ, R.J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* **294**: 1307-1313.

- SHPAKOVITCH, V.M., BRZOSKA, T., BUDDENKOTTE, J., STROH, C.,  
SOMMERHOFF, C.P., ANSEL, J.C., SCHULZE-OSTHOFF, K., BUNNETT,  
N.W., LUGER, T.A. & STEINHOFF, M. (2002) Agonists of proteinase-activated  
receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor  
kappaB in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* **118**:  
380-385.
- SHPAKOVITCH, V.M., VARGA, G., STREY, A., GUNZER, M., MOOREN, F.,  
BUDDENKOTTE, J., VERGNOLLE, N., SOMMERHOFF, C.P., GRABBE, S.,  
GERKE, V., HOMEY, B., HOLLENBERG, M., LUGER, T.A. & STEINHOFF,  
M. (2004) Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil  
cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-  
D collagen lattices. *J Leukoc Biol.* **76**: 388-398.
- SMART, E.J., YING, Y., DONZELL, W.C. & ANDERSON, R.G. (1996) A role for  
caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma  
membrane. *J Biol Chem.* **271**: 29427-29435.
- SONG, K.S., SCHERER, P.E., TANG, Z., OKAMOTO, T., LI, S., CHAFEL, M., CHU,  
C., KOHTZ, D.S. & LISANTI, M.P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal,  
cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma  
and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J  
Biol Chem.* **271**: 15160-15165.

- SOUAZE, F., ROSTENE, W. & FORGEZ, P. (1997) Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* **272**: 10087-10094.
- STACHOWIAK, M.K., MAHER, P.A., JOY, A., MORDECHAI, E. & STACHOWIAK, E.K. (1996) Nuclear localization of functional FGF receptor 1 in human astrocytes suggests a novel mechanism for growth factor action. *Brain Res Mol Brain Res.* **38**: 161-165.
- STAEHELIN, M. & SIMONS, P. (1982) Rapid and reversible disappearance of beta-adrenergic cell surface receptors. *Embo J.* **1**: 187-190.
- STEINHOFF, M., BUDDENKOTTE, J., SHPACOVITCH, V., RATTENHOLL, A., MOORMANN, C., VERGNOLLE, N., LUGER, T.A. & HOLLENBERG, M.D. (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev.* **26**: 1-43.
- STEINHOFF, M., CORVERA, C.U., THOMA, M.S., KONG, W., MCALPINE, B.E., CAUGHEY, G.H., ANSEL, J.C. & BUNNETT, N.W. (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol.* **8**: 282-294.

- SURYA, A., STADEL, J.M. & KNOX, B.E. (1998) Evidence for multiple, biochemically distinguishable states in the G protein-coupled receptor, rhodopsin. *Trends Pharmacol Sci.* **19**: 243-247.
- SWIFT, S., SHERIDAN, P.J., COVIC, L. & KULIOPULOS, A. (2000) PAR1 thrombin receptor-G protein interactions. Separation of binding and coupling determinants in the galpha subunit. *J Biol Chem.* **275**: 2627-2635.
- TAKAI, Y., SASAKI, T. & MATOZAKI, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**: 153-208.
- TAKEUCHI, T., HARRIS, J.L., HUANG, W., YAN, K.W., COUGHLIN, S.R. & CRAIK, C.S. (2000) Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem.* **275**: 26333-26342.
- TANG, Z., SCHERER, P.E., OKAMOTO, T., SONG, K., CHU, C., KOHTZ, D.S., NISHIMOTO, I., LODISH, H.F. & LISANTI, M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* **271**: 2255-2261.
- TANOWITZ, M. & VON ZASTROW, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *J Biol Chem.* **277**: 50219-50222.

- TEDDER, T.F., STEEBER, D.A., CHEN, A. & ENGEL, P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J.* **9**: 866-873.
- TOEWS, M.L. & PERKINS, J.P. (1984) Agonist-induced changes in beta-adrenergic receptors on intact cells. *J Biol Chem.* **259**: 2227-2235.
- VERGNOLLE, N. (1999) Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol.* **163**: 5064-5069.
- VERGNOLLE, N., HOLLENBERG, M.D., SHARKEY, K.A. & WALLACE, J.L. (1999) Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol.* **127**: 1083-1090.
- VERGNOLLE, N., MACNAUGHTON, W.K., AL-ANI, B., SAIFEDDINE, M., WALLACE, J.L. & HOLLENBERG, M.D. (1998) Proteinase-activated receptor 2 (PAR2)-activating peptides: identification of a receptor distinct from PAR2 that regulates intestinal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 7766-7771.
- VERRALL, S., ISHII, M., CHEN, M., WANG, L., TRAM, T. & COUGHLIN, S.R. (1997) The thrombin receptor second cytoplasmic loop confers coupling to Gq-like G proteins in chimeric receptors. Additional evidence for a common

transmembrane signaling and G protein coupling mechanism in G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* **272**: 6898-6902.

VON ZASTROW, M. & KOBILKA, B.K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem.* **267**: 3530-3538.

VU, T.K., HUNG, D.T., WHEATON, V.I. & COUGHLIN, S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* **64**: 1057-1068.

WANG, S.C., LIEN, H.C., XIA, W., CHEN, I.F., LO, H.W., WANG, Z., ALI-SEYED, M., LEE, D.F., BARTHOLOMEUSZ, G., OU-YANG, F., GIRI, D.K. & HUNG, M.C. (2004) Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell.* **6**: 251-261.

WARNER, S.J. & LIBBY, P. (1989) Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol.* **142**: 100-109.

WIEGAND, U., CORBACH, S., MINN, A., KANG, J. & MULLER-HILL, B. (1993) Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene.* **136**: 167-175.

XU, W.F., ANDERSEN, H., WHITMORE, T.E., PRESNELL, S.R., YEE, D.P., CHING, A., GILBERT, T., DAVIE, E.W. & FOSTER, D.C. (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 6642-6646.

ZERIAL, M. & MCBRIDE, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**: 107-117.